

NEOPLASTISCHE
IN VITRO-TRANSFORMATION
FETALER HIRNZELLEN
DES MENSCHEN

Dimitrios K. Stavrou

*Diss.
München
1984*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0083

Aus dem Institut für Neuropathologie der Universität
München (em. Vorstand: Prof. Dr. med. O. Stochdorph)

NEOPLASTISCHE IN VITRO-TRANSFORMATION FETALER HIRNZELLEN
DES MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von
Dimitrios K. Stavrou

aus
Arta-Hellas
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. O. Stochdorph

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 7. 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

MEINER FAMILIE

INHALTSÜBERSICHT

	SEITE
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	3
1. "Spontane" neoplastische Zelltransformation in vitro	3
2. Chemisch induzierte neoplastische Zelltrans- formation in vitro	5
3. Virusinduzierte neoplastische Zelltransfor- mation in vitro	9
C. PROBLEMATIK	11
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	13
I. Material und Methodik	13
1. Fetale Hirnzellkulturen	13
a) Primärkulturen	13
b) Subkulturen	13
c) ^3H -Dimethylbenz(a)anthracen (^3H -DMBA)- Behandlung	14
d) Klonierung permanenter Kulturen	14
2. Transplantation	15
3. Lichtmikroskopie	16
4. "Scanning"-Elektronenmikroskopie	17
5. Elektronenmikroskopie	17
6. Nachweis glia-assoziiierter Antigene	18
7. Nachweis gliom-assoziiierter Antigene	18
8. Dibutyryl-cAMP (db-cAMP)-"Differenzierung"	22
9. Partielle Charakterisierung der Viruspartikel	23

II. Ergebnisse	24
1. Lichtmikroskopie	24
2. "Scanning"-Elektronenmikroskopie	26
3. Elektronenmikroskopie	27
4. Glia-assoziierte Antigene	29
5. Gliom-assoziierte Antigene	30
6. Dibutyryl-cAMP (db-cAMP)-"Differenzierung"	30
7. Eigenschaften der Viruspartikel	31
E. DISKUSSION	43
F. ZUSAMMENFASSUNG	51
G. LITERATUR	53

A. EINLEITUNG

Die experimentellen neuroonkologischen Untersuchungen, die in den letzten Jahren durch neue Impulse wesentlich intensiviert wurden, haben zweifellos zum besseren Verständnis zumindest der formalen Pathogenese neurogener Tumoren des Menschen geführt. So konnten durch die selektive in vivo-Cancerisierung des Nervensystems verschiedener Tierspezies Befunde erhoben werden, die auf die Gültigkeit der Feldtransformation (WILLIS, 1953) auch für das Nervensystem und auf die Bedeutung der im Bereich des Gewebsverbandes bei der Tumorentwicklung sich abspielenden Vorgänge (STOCHDORPH, 1955) hinweisen. Insbesondere die Studien über die Frühstadien der Entwicklung neurogener Tumoren in Verbindung mit den Ergebnissen über die Generationszeit transformierter Gliazellen führten zu der allgemein akzeptierten Erkenntnis, daß ein Gliom aus gleichzeitig transformierten Zellen eventuell mit verschiedener Differenzierungstendenz hervorgehen kann (JÄNISCH u. SCHREIBER, 1969; STAVROU, 1970, 1971; ONVORA, 1973). Ferner dürfte - mit Rücksicht auf die unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten transformierter Hirnzellen - in einer bestimmten Entwicklungsphase der Hirngeschwulst die eine oder die andere Zellpopulation vorherrschen (WECHSLER et al., 1969; KLEIHUES et al., 1976; KOESTNER et al., 1972).

Trotz der Fülle von Befunden, die bei der experimentellen in vivo-Induktion neurogener Tumoren erhoben wurden und zum besseren Verständnis der Biologie von Hirntumoren beigetragen haben, ist das in vivo-System für das Erfassen morphologischer, proliferationskinetischer und biochemischer Änderungen transformierter bzw. präneoplastischer und tumorogener Hirnzellen während des Blastomatisierungsprozesses ungeeignet. Hingegen hat die Verwendung von in vitro-Zellsystemen für die Untersuchung verschiedener zellbiologischer Fragestellungen unter standardisierbaren Bedingungen auch in der

Tumorforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Unter diesem Aspekt sind in den letzten Jahren unter Verwendung verschiedener prokaryoten und eukaryoten Zellen zahlreiche in vitro-Testsysteme für Cancerogenitäts-Studien etabliert worden. Allerdings ergaben die vergleichenden Untersuchungen verschiedener Zellfunktionen, wie "repair"-Kapazität, metabolische Leistung, endogene Virusexpression etc., daß bei oder zwischen den verschiedenen Untersuchungsobjekten deutliche systemabhängige Differenzen vorhanden sind (KAKUNAGA, 1978), die einen Rückschluß auf die Verhältnisse beim Menschen nur bedingt zulassen.

Daraus erwächst die Verpflichtung für die in vitro-Untersuchung speziesspezifischer Fragestellungen nach Möglichkeit biologisches Material der entsprechenden Spezies zu verwenden. Die auf der Basis selektierter biologischer Materialien erzielten Befunde können unter Berücksichtigung der Nachteile von in vitro-Systemen, die aus der Ausschaltung organischer Regelmechanismen resultieren, für eine bestimmte Spezies als relevant angesehen werden.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. "Spontane" neoplastische Zelltransformation in vitro

Eines der Hauptziele von in vitro-Transformationsexperimenten ist - neben der Erfassung potentieller cancerogener Verbindungen - das Studium der morphologischen und biochemischen Veränderungen, die normale Zellen unter standardisierten Kultivationsbedingungen während ihrer Umwandlung zu transformierten bzw. präneoplastischen und tumorogenen Zellen erfahren. Unter diesem Aspekt wurden unter Verwendung diploider Zellen verschiedenen Ursprungs zahlreiche Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, durch verschiedene Kultivationsbedingungen, jedoch ohne den Einsatz cancerogener Agentien, eine in vitro-Transformation normaler Zellen zu erreichen (Lit. SANFORD, 1967; KARASAKI et al., 1976; MOREL-CHANY et al., 1978; BARRETT, 1980).

Die meisten dieser Transformationsversuche wurden an fibroblastoiden und epithelialen Zellkulturen verschiedener Herkunft vorgenommen. Die diese Probleme bearbeitenden Autoren kommen übereinstimmend zu dem inzwischen allgemein akzeptierten Ergebnis, daß (a) die normalen Zellen in vitro eine begrenzte Überlebenszeit aufweisen (HAYFLICK, 1965; PAPADOPOULO et al., 1977), (b) eine "spontane" Zelltransformation in vitro ein seltenes Ereignis ist (BERWALD und SACHS, 1965; WEINSTEIN et al., 1975; PAPADOPOULO et al., 1977) und (c) die transformierten Zellen bei der Transplantation in syngene oder immundefiziente Rezipienten nicht tumorogen sind (MARKOVITS et al., 1979). Bei fortgesetzter in vitro-Kultivation können allerdings aus transformierten Kulturen tumorogene Zelllinien entstehen, die sowohl bei nackten Mäusen als auch bei syngen Empängern Tumoren bilden, eine Beobachtung, die auf die Mehrstufigkeit des neoplastischen Transformationsprozesses hinweist (BARRETT, 1980).

Die Dauer der in vitro-Propagierung normaler Zellen scheint nicht von den Kultivationskonditionen, sondern von anderen Faktoren, wie Spezies, Alter, Ursprungsorgan etc., abhängig zu sein. Hirnzellen von Hamsterfeteten konnten 200 - 300 Tage in vitro gehalten und 7 - 9 mal passagiert werden. Hingegen konnten embryonale Hamsterzellen bis zu 600 Tage gezüchtet werden, und sie erreichten dabei die 16. bzw. 20. Passage (PAPADOPOULO et al., 1977). Fetale Hirnzellen der Ratte konnten bis zu 120 Tagen in vitro gezüchtet werden, wobei lediglich die 4. Passage erreicht wurde (LAERUM und RAJEWSKY, 1975).

Die Untersuchungen über das Auftreten "spontaner" Transformation bei in vitro gezüchteten embryonalen Hamsterzellen sowie bei Kulturen aus verschiedenen Organen neugeborener Ratten haben ergeben, daß diese am häufigsten bei Fibroblasten beobachtet wird. Hingegen neigen epitheliale und gliale Zellen nur vereinzelt zu "spontaner" Transformation (PAPADOPOULO et al., 1977; MARKOVITS et al., 1979).

Die Angaben über die Latenzzeit, d.h. über die Zeitspanne vom Anlegen der Primärkultur bis zum Auftreten von Änderungen im Zellproliferations- bzw. Wachstumsverhalten, variieren erheblich. In vitro kultivierte Leberzellen von 10 Tage alten Ratten zeigten ab der 30. Passage Evidenzen einer Transformation (MOREL-CHANY et al., 1978). Hingegen zeigten in vitro explantierte Leberzellen von einer gesunden erwachsenen Ratte, die 6 Monate lang als Stationärkultur gehalten wurden, bereits nach den ersten 10 Passagen Transformationszeichen (KARASAKI et al., 1976). Bei Zellkulturen aus Hamsterembryonen konnten erst nach 9-12 Monaten in vitro-Kultivation (PAPADOPOULO et al., 1977) bzw. nach 43-55 Passagen Zeichen der Transformation beobachtet werden (BARRETT, 1980). Ebenfalls eine "spontane" Transformation konnte auch bei in vitro kultivierten fetalen Hirnzellen der Maus nach einer 11-monatigen Kultivationsperiode erzielt werden (MARKOVITS et al., 1979).

Beim Vergleich der Proliferationseigenschaften von in vitro "spontan" transformierten und tumorogenen diploiden Zellen fällt auf, daß die Latenzzeit, d.h. der Zeitraum von der in vivo-Transplantation einer bestimmten Zellzahl bis zur Tumorentwicklung, sehr variabel ist. Neoplastisch transformierte Leberzellen erwachsener Ratten zeigen eine hohe in vivo-Proliferationsgeschwindigkeit und bilden innerhalb von 10-18 Tagen nach der Transplantation Tumoren (KARASAKI et al., 1976). Hingegen sind "spontan" in vitro transformierte tumorogene Leberzellen neugeborener Ratten durch eine offenbar geringe Proliferationsrate in vivo gekennzeichnet, da erst nach einer Latenzzeit von 4-9 Monaten Tumorentstehung an der Inokulationsstelle beobachtet werden konnte (MOREL-CHANY et al., 1978). Jedoch scheint hinsichtlich der in vivo-Proliferationseigenschaften zwischen transformierten Leberzellen neugeborener Ratten und embryonaler Hamsterzellen eine Korrelation zu bestehen. Die subkutane Inokulation einer ausreichenden Zellzahl von in vitro neoplastisch transformierten Hamsterzellen führt ähnlich wie bei Babyratten-Leberzellen nach einer Latenzperiode von durchschnittlich 6 Monaten zur Tumorentstehung (BARRETT, 1980).

2. Chemisch induzierte neoplastische Zelltransformation in vitro

Eine wesentliche Beschleunigung des in vitro-Transformationsprozesses bzw. eine regelmäßige maligne Transformation kultivierter Zellen wurde erst durch den Einsatz cancerogener Chemikalien erreicht. BERWALD und SACHS (1963, 1965) konnten zeigen, daß die Behandlung von in vitro gezüchteten embryonalen Hamsterzellen (SHE) mit cancerogenen Kohlen-

wasserstoffverbindungen regelmäßig zur neoplastischen Zelltransformation führt.

Aufgrund der Möglichkeit der malignen Transformation normaler Zellen in vitro und unter Berücksichtigung der Bedeutung cancerogener Verbindungen als Ursache von Tumorerkrankungen beim Menschen wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (Lit. BARRETT, 1980). Diese Bemühungen führten zur Etablierung verschiedener Zellkultursysteme, vor allem für die Untersuchung (a) der Wirkung potentieller cancerogener bzw. mutagener Substanzen und (b) für die Erforschung der Mechanismen der chemischen Mutagenese bzw. Cancerogenese auf molekularer Ebene.

Für in vitro-Cancerogenitätsstudien wurden zunächst regelmäßig embryonale Mischkulturen bzw. embryonale fibroblastoide Zellen verschiedenen Ursprungs verwendet (Lit. bei HEIDELBERGER, 1973). Der in vitro-Effekt verschiedener polyzyklischer Kohlenwasserstoffverbindungen wurde unter Verwendung embryonaler Hamsterzellen studiert (MARKOVITS et al., 1974, 1975; PAPADOPOULO et al., 1977). Dabei konnte festgestellt werden, daß es sich im allgemeinen bei den toxischen und transformierenden Wirkungen chemischer Verbindungen um zwei unterschiedliche Eigenschaften handelt. Bei einigen chemischen Cancerogenen scheinen allerdings diese Eigenschaften konvergierend zu sein. Während nämlich das hochtoxische Benzo(a)pyren auch stark onkogen ist, zeichnet sich 2-Chlorobutadien durch niedrige Toxizität, aber durch hohe Cancerogenität aus (PAPADOPOULO et al., 1977).

Die in vitro durch chemische Agentien maligne transformierten embryonalen Hamsterzellen zeigen im Vergleich zu den normalen Zellen gleichen Ursprungs fundamentale Unterschiede sowohl hinsichtlich ihrer morphologischen und Wachstumscharakteristika als auch bezüglich ihrer Transplantabilität. Die Induktionszeit, d.h. die Dauer vom Beginn der Behandlung

der Zellen mit chemischen Onkogenen bis zur Manifestation der malignen Transformation, ist unterschiedlich und scheint nicht nur von der Herkunft der Zellen, sondern auch von der Natur des verwendeten Onkogens abhängig zu sein. Bei Verwendung von Methylbenz(a)anthracen wurde die maligne Transformation 6 Monate nach Behandlungsbeginn bzw. in der 10. Passage beobachtet. Hingegen führte die Behandlung embryonaler Hamster-Mischkulturen bzw. Hirnzellkulturen mit Dimethylbenz(a)anthracen erst nach 18 Monaten bzw. in der 22. Passage zur malignen Transformation (PAPADOPOULO et al., 1977).

Die unterschiedliche Dauer der Induktionszeit einer malignen Transformation wird bei der Verwendung verschiedener Onkogene am gleichen Zellmaterial besonders deutlich. Während die Behandlung embryonaler Hamsterhirnzellkulturen mit Benzo(a)pyren bereits nach 2-monatiger Kultivationsdauer zu einer Transformation führt, wurde diese beim Austausch von Benzo(a)pyren gegen Methylnitrosoharnstoff erst nach 5-monatiger in vitro-Propagierung beobachtet (MARKOVITS et al., 1976, 1977). Allerdings scheint die Herkunft des Zellmaterials die Dauer der Latenzzeit ebenfalls zu beeinflussen. Im Gegensatz zu den bei Hamsterzellen erhobenen Befunden wurde nämlich bei der Behandlung von fetalen Hirnzellen der Maus mit Benzo(a)pyren erst 7-8 Monate (7.-8. Passage) nach Behandlungsbeginn eine maligne Transformation beobachtet (MARKOVITS et al., 1979).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß ein Großteil der bei Menschen vorkommenden Tumoren epithelialen Ursprungs sind, wurden zur Durchführung von Mutagenitäts- bzw. Cancergenitätsstudien auch Epithelzellkulturen in vitro etabliert (Lit. bei WEINSTEIN et al., 1975). Die vergleichende Analyse von Morphologie, Wachstumsverhalten, biochemischen Eigenschaften etc. normaler und maligne transformierter Leberzellen der Ratte hat ergeben, daß die bei der Transformation fibroblastoider Zellen festgestellten Transformationskrite-

rien für die Beurteilung epithelialer Zellen unzureichend sind. Allerdings bietet die Überprüfung der Frage nach dem Wachstumsverhalten in "soft agar" ein einfaches und zuverlässiges Kriterium für die in vitro-Unterscheidung normaler und maligne transformierter Leberzellen. Dies deshalb, weil in "soft agar" weder normale noch transformierte, sondern nur tumorogene Leberzellen proliferieren können (WEINSTEIN et al., 1975). Für in vitro-Transformations- bzw. Mutationsstudien wurden in der Regel Zellkulturen verschiedener Laboratoriumstiere herangezogen. Hingegen sind für solche Untersuchungen Zellkulturen des Menschen nur selten und mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt worden. Bei einigen dieser Untersuchungen wurden nicht näher charakterisierte Zellen, die aus "Tumorgewebe" des Menschen (M. Recklinghausen) isoliert worden waren und daher nicht zweifelsfrei als normal angesehen werden können, sowie permanente Osteosarkom-Zellkulturen verwendet (BENEDICT et al., 1975; RHIM et al., 1975). Darüber hinaus kamen für in vitro-Transformationsexperimente auch Zellkulturen, die aus normal aussehenden Hautpartien von Xeroderma pigmentosum-Patienten mit Hauttumoren sowie aus Hautproben einer nicht an Xeroderma pigmentosum erkrankten Person etabliert wurden, zur Anwendung (SHIMADA et al., 1976). Die Behandlung von normalen und genetisch defekten fibroblastoid aussehenden Zellen mit N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin verursachte allerdings keine neoplastische Konvertierung (RHIM et al., 1975; SHIMADA et al., 1976). Über eine erfolgreiche neoplastische in vitro-Transformation von Zellen des Menschen wurde von KAKUNAGA (1978) berichtet. Die zur Transformation verwendeten diploiden Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien einer gesunden Person gewonnen und mit dem potenten Cancerogen Nitroquinolin-1-oxid behandelt. Die Zellen zeigten 7 bis 14 Wochen nach Behandlungsbeginn morphologische Transformationszeichen und größtenteils tumorogene Eigenschaften bei der Transplantation in nackte (thymuslose) Mäuse (KAKUNAGA, 1978).

3. Virusinduzierte neoplastische Zelltransformation in vitro

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß es für einige Tumorerkrankungen des Menschen Evidenzen für eine ursächliche Beteiligung von RNA-Viren gibt (Leukämien, Melanom etc.), wurde in den letzten Jahren die Transformationspotenz verschiedener Viren in vivo und in vitro geprüft. Die Beobachtung, daß das humane Adenovirus Typ 12 nach intracerebraler Inoculation bei Hamstern Hirntumoren erzeugt (HUEBNER et al., 1962), und die daraus abgeleiteten möglichen Zusammenhänge zwischen Virusinfektion und Entstehung bestimmter intrakranieller Geschwülste, initiierten zahlreiche in vitro-Experimente (Lit. bei RABOTTI, 1972; BIGNER und SWENBERG, 1977).

Für die neoplastische in vitro-Transformation von Hirnzellen verschiedener Herkunft (Hamster, Maus, Huhn, Hund, Affe etc.) wurden erfolgreich Rous-Sarkomvirus (DEINHARDT, 1966; DEINHARDT et al., 1972; RABOTTI et al., 1966, 1978; JÄNISCH et al., 1968; BIGNER et al., 1969), Papovavirus (SHEIN, 1967; TANAKA et al., 1976), Polyomavirus (SHEIN, 1970, DeMICCO et al., 1978) und Herpes simplex virus (DARAI und MUNK, 1976) eingesetzt. Außer Kulturen aus Nervengewebe verschiedener Tierspezies, einschließlich Primaten, wurden auch Hirnzellkulturen des Menschen (SANTOLI et al., 1975) für in vitro-Transformationsexperimente mittels des SV 40-Virus verwendet.

Die Latenzzeit zwischen Infektion der in vitro kultivierten Hirnzellen und dem Auftreten morphologischer Transformationszeichen ist sehr variabel. Während bei der Behandlung von Hamster-Hirnzellen mit dem Rous-Sarkomvirus bereits 3-4 Wochen nach der Infektion Transformationsherde beobachtet wurden (RABOTTI et al., 1978), konnten in den mit Polyomavirus infizierten Hirnzellkulturen gleichen Ursprungs erst 4 Monate nach der Infektion Transformationsherde nachgewiesen wer-

den (DeMICCO et al., 1978). Hamsterfibroblasten scheinen hingegen mit Polyomavirus wesentlich schneller als Hirnzellen transformiert werden zu können (MONTAGNIER et al., 1966).

Die Ergebnisse beim Nachweis des zur Zelltransformation verwendeten Virus in den neoplastischen Zellen zeigen, daß nur in einzelnen Fällen Viruspartikel in den Tumorzellen enthalten sind. Dies trifft insbesondere für die durch Polyomavirus transformierten Hirnzellen bzw. Gliazellen zu, die sowohl in vitro als auch in vivo Typ-H virusähnliche Partikel enthalten (DeMICCO et al., 1978). Hingegen wurden bei den durch Rous-Sarkomvirus, Herpes simplex Virus und humanem Papovavirus BK transformierte Zellen nur Virusantigene nachgewiesen (DARAI und MUNK, 1976; RABOTTI et al., 1978; TANAKA et al., 1978).

Hinsichtlich der Expression viraler Information von transformierten Zellen wurde berichtet, daß Oncorna-Viruspartikel Typ C sowohl bei spontan als auch bei chemisch transformierten Hepatocyten der Ratte nachgewiesen wurden (WEINSTEIN et al., 1975). Ähnliche Viruspartikel wurden auch bei einer spontan transformierten Hamster-Zelllinie nach Behandlung mit 5-Jodo-2-deoxyuridin beobachtet (YANIV und EYLAN, 1978). Darüber hinaus ist bekannt, daß scheinbar nicht infizierte Zellen verschiedener Tierspezies endogene virale Informationen von RNA-Tumurviren (LIEBER et al., 1973) enthalten. Die Produktion von Viruspartikeln geschieht entweder spontan (RASHEED et al., 1976b) oder sie wird durch die Behandlung mit physikalischen oder chemischen Agentien induziert (Lit. bei YANIV und EYLAN, 1978). Die auf diese Weise produzierten endogenen Oncornaviren können exogen embryonale Rattenzellen infizieren und diese maligne transformieren (RASHEED et al., 1976a).

C. PROBLEMATIK

Nach den bislang vorliegenden Untersuchungen kann als gesichert gelten, daß unter bestimmten Voraussetzungen cancerogene und teratogene Verbindungen sowohl in der Umwelt als auch im Organismus verschiedener Spezies einschließlich des Menschen entstehen können. Dies gilt auch für transplacental wirksame Nitrosamide, die unter experimentellen Bedingungen regelmäßig zur Entstehung neurogener Tumoren bei verschiedenen Laboratoriumstieren führen (Lit. bei STAVROU et al., 1984). Auf transplacentarem (diaplacentarem) Induktionsweg ließen sich mit verschiedenen Onkogenen auch bei anderen Organen Tumoren erzeugen. Diese zunächst für die experimentelle Onkologie interessanten Ergebnisse verdienen unter dem Aspekt der Beobachtung von HERBST et al. (1971) insofern besondere Beachtung, als gezeigt werden konnte, daß zwischen dem Auftreten von Vaginalcarcinomen bei jungen Mädchen und der Behandlung ihrer Mütter mit Diäthylstilbestrol während des ersten Schwangerschaftstrimenons ein direkter Zusammenhang besteht.

Insgesamt ist zu berücksichtigen, daß alle Erfahrungen über die Wirkung organischer Nitroverbindungen auf experimentellen Untersuchungen beruhen, die bei kleinen Laboratoriumstieren durchgeführt wurden. Bei der Übertragung solcher Befunde auf andere Spezies ist natürlich erhöhte Zurückhaltung geboten. Dies gilt in besonderem Maße für Procancerogene, die offenbar erst nach ihrer Metabolisierung ("Giftung") cancerogene Wirkung entfalten können. Demnach würden Procancerogene, die regelmäßig bei Nagetieren Tumoren induzieren, als Risiko für den Menschen nur beim Vorliegen zumindest vergleichbarer Stoffwechselsituationen in Betracht kommen.

Aus dieser Feststellung und unter Berücksichtigung der Notwendigkeit der richtigen Abschätzung der Bedeutung neuro-

onkogener Verbindungen in umwelthygienischer und präventivmedizinischer Hinsicht ergibt sich zwangsläufig der Bedarf der Einbeziehung von Zellsystemen humanen Ursprungs für in vitro-Cancerogenitätsstudien. Dies um so mehr, als die bislang unter Verwendung von Materialien verschiedener Tierarten etablierten Testsysteme durch deutliche Unterschiede in verschiedenen biologischen Funktionen gekennzeichnet sind (KAKUNAGA, 1978). Da diese Unterschiede wichtige Zellfunktionen wie Reparaturkapazität, Metabolismus, Expression endogener Viruspartikel etc. betreffen, dürften Diskrepanzen in der Interpretation von bei solchen Systemen erzielten Ergebnisse und der cancerogenen Potenz von Umweltchemikalien für den Menschen unvermeidbar sein.

Unter Berücksichtigung dieser Zusammenhänge hatten die vorliegenden Untersuchungen das Ziel, fetale Hirnzellen des Menschen in vitro zu züchten und zunächst den Einbau von ^3H -Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) - welches bekanntlich bei der Ratte auf transplacentarem Wege Tumoren des Nervensystems induziert (NAPALKOV und ALEXANDROV, 1974) - zu studieren. Darüber hinaus sollte bei Kurzzeitkulturen gleichen Ursprungs die Biotransformation von DMBA bzw. seine Reaktivität mit Gliazell-DNA analysiert werden.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methodik

1. Fetale Hirnzellkulturen

a) Primärkulturen

Für das Anlegen von Primärkulturen wurden die Hirne von acht operativ gewonnenen Feten der 12. - 18. Schwangerschaftswoche verwendet*. Teile des Großhirns wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, in sterile Petrischalen transferiert und mit lauwarmer steriler PBS-A-Lösung (Ca^{++} und Mg^{++} -freie "Phosphate-Buffered-Saline", pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Gewebstückchen mit einer Schere fragmentiert und in Falcon-Plastikflaschen explantiert. Nach dem Antrocknen der Gewebsfragmente wurden sie mit Medium (M-199, Gibco Europ, Scotland), das 20% fetales Kälberserum (FBS, Flow-Lab., Scotland), 8,8% NaHCO_3 und Antibiotika (100.000 I.E. Penicillin/ml, 100 μg Dihydrostreptomycin/ml) enthielt, vorsichtig überschichtet. Neben den Explantatkulturen wurden auch Suspensionskulturen angelegt. Alle Kulturen wurden im geschlossenen System bei 37°C bebrütet.

b) Subkulturen

Zur Gewinnung von Subkulturen wurde die Trypsinierungsmethode angewandt. Der Zellrasen wurde mit einer erwärmten STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versen) überschichtet und unter Wie-

* Das Untersuchungsmaterial wurde freundlicherweise von Dr. E. Koschade (Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Dachau) zur Verfügung gestellt.

gen vorsichtig gewaschen. Nach dieser Vortrypsinierung wurde die Waschlösung abgegossen und der Zellrasen mit 1-2 ml STV, je nach Größe der Plastikflaschen, erneut überschichtet. Die Kulturen wurden danach 3-5 min im Zellinkubator belassen, bis sich die meisten Zellen von der Unterlage gelöst hatten oder durch vorsichtiges Schütteln der Kulturgefäße der gleiche Effekt erzielt wurde. Die abgelösten Zellen wurden mit etwas Medium/10% FBS suspendiert. Auftretende Zellaggregate wurden durch kräftiges Aufziehen und Ausblasen mit einer Pipette gelöst. Die Zellsuspension wurde mit Nährmedium auf die entsprechende Menge verdünnt und zunächst 1:2 - 1:4 geteilt und auf neue Kulturgefäße ausgesät.

c) ^3H -Dimethylbenz(a)anthracen (^3H -DMBA)-Behandlung

Konfluente Hirnzellkulturen wurden nach 12-tägiger in vitro-Kultivation (1. bzw. 2. Passage) mit ^3H -DMBA (300 $\mu\text{Ci/ml}$ Kulturmedium) behandelt. Nach 24-stündiger Bebrütungszeit im Zellinkubator wurde das Medium/ ^3H -DMBA abgegossen und die Zellen zur weiteren Verarbeitung bzw. zur Bestimmung der ^3H -DMBA-Einbaurate geerntet. Für jedes ^3H -DMBA-Experiment wurden parallel unbehandelte Kontrollkulturen geführt.

d) Klonierung permanenter Kulturen

Die Klonierung der Kultur 79H-G-396 wurde etwa 28 Monate nach Kultivationsbeginn und zwar in der 135. Passage durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert und 5 min bei 800 Upm abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Medium aufgenommen und resuspendiert. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Zellzahl auf ca. 20 Zellen/ml

eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml Medium /20% FBS verdünnt und in Zellkulturflaschen pipettiert. Bei Farbumschlag des Mediums in einen alkalischen pH-Bereich wurde dem Nährmedium konditioniertes Medium (CM) im Verhältnis 1:2 zugesetzt. Die Herstellung des CM erfolgte in Anlehnung an die Angaben von CHEN et al. (1975). Dazu wurde das Medium einen Tag alter Subkulturen der ursprünglichen Zelllinie verwendet. Die Nährlösung wurde abgegossen, bei 1500 Upm abzentrifugiert und dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Im Nährmedium vorhandene proliferationsfähige Zellen werden durch diese Prozedur zerstört und eine Verunreinigung der zu klonierenden Zellen vermieden.

Nach 6 - 8 Tagen konnte das Auswachsen von sichtbaren Zellkolonien beobachtet werden. Die einzelnen Kolonien wurden mittels Trypsinierung isoliert. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen auf jede abzutrypsinierende und zuvor gekennzeichnete Kolonie ein etwa 5 mm hoher Metallzylinder aufgesetzt. In diesen wurde mit einer Pasteurpipette drei Tropfen STV-Lösung gegeben. Nach einer Einwirkzeit von etwa 5 min wurden die Zellen mit Pasteurpipetten aufgezo-gen und in neue Kulturgefäße mit 5 ml Medium/20% FBS gebracht.

2. Transplantation

Zur Prüfung der Tumorigenität der in vitro etablierten Zelllinien sowie für histologische bzw. ultrastrukturelle Untersuchungen wurden regelmäßig Zelltransplantationen durchgeführt.

a) Intracerebrale Transplantate

Um intracerebrale Transplantationstumoren zu erzeugen, wurden Zellen der permanenten Linie abtrypsiniert, in PBS-A gewaschen und im Coulter-Counter (Coulter Electronics, Herts, England) gezählt. 1×10^5 bis 5×10^6 Zellen wurden in 5 μ l PBS-A suspendiert und bei 4-6 Wochen alten Balb c/nu nu Mäusen mittels einer No. 17-Injektionsnadel - nach Perforation der Schädeldecke - paramedian in Höhe des Scheitelbeines in der Großhirnrinde inokuliert. Darüber hinaus wurde auch suspendiertes Biopsiematerial aus intracerebralen und subkutanen Transplantaten intracerebral appliziert.

b) Subkutane Transplantate

Für das Wachstum subkutaner Transplantationstumoren erwies sich die Region dorsal zwischen den Schulterblättern (Regio interscapularis) für die Versuchstiere als günstig. Um Tumoren für die Erstellung von in vivo-Wachstumskurven zu erzeugen, wurden 10×10^6 Gliomzellen subkutan transplantiert.

3. Lichtmikroskopie

Gewebeproben der Transplantationstumoren und der Tumormetastasen wurden für die lichtmikroskopische Untersuchung in 6%igem neutralen Formol fixiert und in Paraplast eingebettet. Die Schnitte wurden nach den in der Diagnostik neurogener Tumoren üblichen Färbeverfahren gefärbt. Die permanenten Zelllinien wurden nach jeder 15. in vitro-Passage auf Zellmorphologie bzw. Wachstumscharakteristika untersucht. Dazu wurden Lamellenkulturen in "Leighton-tubes" oder Flaschen-

kulturen in situ mit PBS-A (Ca^{++} - und Mg^{++} -frei, pH 7,2) gewaschen, in BOUIN-Lösung fixiert und nach den üblichen Verfahren mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

4. "Scanning"-Elektronenmikroskopie

Semikonfluent bewachsene "cover-slips" wurden nach dem Waschen mit PBS-A in 1%igem Glutaraldehyd fixiert und mittels einer aufsteigenden Alkohol- bzw. Essigsäure-Isoamylesterreihe entwässert. Danach wurden die Präparate in der "critical-point"-Anlage (Bomar SPC-900/Ex²) getrocknet, mit Gold (3,5 min, 5-6 Ampère) bedampft und im Rasterelektronenmikroskop (Cambridge S⁴-10) untersucht.

5. Elektronenmikroskopie

Für die ultrastrukturelle Untersuchung wurden Tumorproben in 6,25%igem Glutaraldehyd fixiert, in Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen (pH 7,4), in 1%igem Osmiumtetroxyd nachfixiert, in Aceton dehydriert und in Epon eingebettet. Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und Ultra-
dünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

6. Nachweis glia-assoziiierter Antigene

Zum immunhistochemischen Nachweis gliaspezifischer Proteine (S-100- und GFA-Protein) wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Technik (Sandwich-Technik, COONS et al., 1957) angewendet. Für den Test wurden subkonfluente "cover-slips" verwendet. Die "cover-slips" wurden aus den "Leighton-tubes" entnommen, dreimal 5 min in PBS-A gewaschen, 3 min in kaltem Aceton/4°C fixiert und 5 min bei Zimmertemperatur getrocknet. Auf die frisch fixierten Präparate wurden die entsprechenden Antiseren* (1:2 bis 1:32) getropft und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, 3 x 5 min in PBS-A gewaschen, getrocknet und mit FITC-gekoppeltem Anti-Kaninchen-Globulin (1:32) vom Schaf (Meloy Lab., Springfield, VA, USA) abermals 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überschuß entfernt, die "cover-slips" dreimal in PBS-A gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingeschlossen. Als Kontrolle dienten Präparate, die mit den entsprechenden Antigenen adsorbierten Antiseren, ohne Antiseren bzw. mit normalen Kaninchenserum inkubiert wurden.

7. Nachweis gliom-assoziiierter Antigene

Für den Nachweis gliom-assoziiierter Antigene wurden monoklonale Antikörper (McAbs), die aus durch Fusion von X63-Ag8.653 x Maus-Splenocyten (Balb/c) entstandenen Hybridomen (DeMURALT et al., 1984) gewonnen wurden, eingesetzt.

* Das Serum gegen GFAP wurde freundlicherweise von Dr. Maunoury (Lab. d'Anatomie Pathologique, Hôpital Sainte-Anne, Paris) zur Verfügung gestellt.

Zur Gewinnung der für die Fusionen notwendigen Immunsplenozyten wurden Balb/c-Mäuse mit Zellpräparationen aus operativ gewonnenem Hirntumormaterial des Menschen immunisiert. Als Antigen wurden darüber hinaus auch in vitro gezüchtete Tumorzellen von Astrozytomen des Menschen verwendet. Die Bindungsaffinität monoklonaler Antikörper an Gliomzellen wurde mit Hilfe folgender Methoden untersucht:

a) Indirekte Immunperoxidase (IMP)

Die als Targetzellen verwendeten Gliomzellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 500-1000 Zellen pro Loch auf Terasaki-Platten ausgesät (PATERAKI et al., 1981). Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen einmal mit temperiertem PBS-A gewaschen und 5 min mit Methanol/Aceton 1:1, 4°C fixiert. Nach mindestens 10 min Lufttrocknung wurden 10 µl Hybridomüberstand als erster Antikörper in jedes Loch pipettiert und die Platte geschlossen eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als positive Kontrolle diente 1:20 verdünntes Anti-Maus-Serum und als negative Kontrolle Kulturüberstand von X63-Ag8.653-Myelomzellen. Anschließend wurde dreimal mit PBS-A gewaschen, 10-20 min inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen), 1:100 in PBS-A/5% FBS verdünnt und jeweils 20 µl pro Plattenvertiefung aufgetragen. Die sich anschließenden Waschungen und Inkubationen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Darstellung des Antigen-Antikörper-Komplexes fand das Substrat nach NEXØ (1977) Verwendung. Dafür wurden 20 mg 3-Amino-2-äthyl-carbazol (Sigma, München) in 5 ml Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) gelöst, in 95 ml 50 mM Acetatspuffer, pH 5,0 aufgenommen und filtriert. Unmittelbar vor

Gebrauch der Lösung wurden 50 μl H_2O_2 (30%ig) zugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min waren die positiv reagierenden Zellen in den Mikrolöchern makroskopisch deutlich an ihrer rotbraunen Färbung zu erkennen und die Platten wurden gründlich in Aqua bidest. gewaschen.

b) "Enzyme-linked-immunosorbent-assay" (micro-ELISA)

Das Anzüchten der Targetzellen erfolgte 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf flexiblen 96-Loch-Mikroplatten (Flow-Lab., Bonn, Nr. 76-381-04). Fixiert wurden sie 5 min mit 4°C kaltem Äthanol/Aceton 1:1 (SUTER et al., 1980). Der weitere Ablauf des Testes richtete sich nach der von POSNER et al. (1982) beschriebenen Methode. Auf die Zellen wurden pro Plattenvertiefung 20 μl Hybridomkulturüberstand als erster Antikörper pipettiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-A/5% FBS wurden die Zellen mit 50 μl des zweiten Antikörpers, einem 1:100 verdünnten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin, das mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (Dako, Kopenhagen), überschichtet. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 4°C und anschließendem sechsmaligen Waschen wurden 100 μl Substrat in jedes Loch gegeben. Das Substrat bestand aus 1 mg/ml ortho-Phenyldiamin (Sigma, München), gelöst in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5) und 4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ einer 3%igen H_2O_2 -Lösung. Die Ablesung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm nach einer Reaktionszeit von 30 min mit dem Photometer Titertek^R, Multiscanner MC (Flow Lab., Bonn). Zur Ermittlung des Leerwertes wurde die erste senkrechte Reihe der Mikroplatte an Stelle des zweiten Antikörpers mit PBS-A behandelt. Als positive Kontrolle diente Anti-Maus-Serum. Zur Ermittlung des Negativkontrollwertes diente Kulturüberstand von X63-Ag8.653-Zellen.

c) Indirekte Immunofluoreszenz (IMF)

Die Targetzellen wurden 2 bis 3 Tage vor dem Test auf Glaslamellen ("cover-slips") in "Leighton-tubes" ausgesät. Die subkonfluenten Kulturen wurden zum einen unfixiert, zum anderen mit 4°C kaltem Aceton fixiert, verwendet. Die Zellen wurden mit Hybridomüberstand als erstem Antikörper überschichtet und bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 30 min wurden die Lamellen 3 x 5 min in PBS-A gewaschen, getrocknet und weitere 30 min bei 37°C mit dem zweiten Antikörper - einem Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Immunoglobulin (Verdünnung 1:10, Dako, Kopenhagen) - inkubiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal in PBS-A gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingeschlossen. Als Kontrolle dienten Lamellen, die mit Myelomzellüberstand und Mausserum inkubiert worden waren.

d) ³H-Radioimmunoassay (RIA)

Der RIA wurde entsprechend den Angaben von KUMMER et al. (1981) durchgeführt. Es wurden Gliomzellen sowie fetale Hirnzellen aus der zweiten Kultivationsstufe verwendet.

Nach einer vorherigen Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch einer 96-Linbroplatte (Greiner, Flachboden) ausgesät und mit 10 µl der Hybridomkulturüberstände 30 min bei Raumtemperatur bebrütet. Nach dreimaligem Waschen wurden 10 µl des tritiummarkierten Ziegen-anti-Maus-Immunoglobulins auf gleiche Weise mit den Zellen inkubiert.

Nach abschließendem dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese mittels einer 12-kanaligen Zellsammelapparatur auf Fiberglasfilterstreifen transferiert. Der Filterstreifen wurde auf einer Wärmeplatte getrocknet, in Einzelproben zerschnitten, diese in Toluol-gefüllte Gefäße verteilt und die Radioaktivität im Flüssig-Scintillationsspektrometer (Packard, Warendville) gemessen.

8. Dibutyryl-cAMP (db-cAMP)-"Differenzierung"

Der Einfluß der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration auf die Gestalt kultivierter Gliomzellen wurde in Anlehnung an die Angaben von STEINBACH und SCHUBERT (1975) untersucht. Aus dem Mononatrium-Salz von N⁶,O^{2'}-Dibutyryl-Adenosin-3',5'-Monophosphat, Grad II (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) wurde mit Aqua dest. eine Stammlösung (25 mM) hergestellt, mittels Millipore-Filter steril filtriert und in kleinen Portionen bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren. Für den Test wurden 24 Stunden alte, subkonfluente Kulturen verwendet. Dem teilweise verbrauchten Medium der in "Leighton-tubes" gezüchteten Zellen wurden 0,1 ml Aliquots zugesetzt und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Nach einer Inkubation von 10-36 Stunden bei 37°C wurde der Test gestoppt und die "cover-slips" für die lichtoptische und "scanning"-elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert.

9. Partielle Charakterisierung der Viruspartikel

a) ³H-Uridin-Markierung

Subkonfluente Tumorzellkulturen wurden mit PBS-A gewaschen und mit DMEM/10% FBS unter Zugabe von ³H-Uridin (50 µCi/ml Medium, spez. Aktivität 35-50 Ci/mmol) 24 Std. inkubiert. Danach wurde das Medium im Abstand von 12 Stunden gewechselt (4x) und die Zellkulturüberstände bei 3000 und 8000 Upm zentrifugiert. Dieser Überstand wurde 1¹/₂ Std. bei 26.000 Upm nochmals zentrifugiert (SW 27, Beckman, 4°C). Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Tris-Puffer suspendiert und auf einen linearen 20-50% Saccharosegradienten aufgetragen. Nach einer Zentrifugation von 4 Std. bei 38.000 Upm (SW 41, Beckman, 4°C) wurde das Zentrifugenröhrchen mit einer Injektionskanüle am Röhrchenboden punktiert und in Fraktionen zu je 0,4 ml gesammelt. Die Saccharosekonzentration und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurden in einem Refraktometer bzw. einem Scintillationszähler (Packard) gemessen und in einem Diagramm aufgetragen.

b) Immunofluoreszenz

Die Tumorzellen wurden in Petrischälchen (6 cm Ø) ausgesät. Subkonfluente Kulturen wurden mit PBS-A gewaschen und mit 70%igem Alkohol fixiert (20', 20°C). Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation (1 Std., 37°C) mit folgenden Antiseren: r-a SSV p30, r-a SSV gp70, r-a SSV ges., r-a MuLV p30, r-a BEV p28, g-a HTLV p24, m-a HTLV p19 (mono-cl.)*. Nach mehrmaligem Waschen (5 x PBS-A) wurden die Kulturen mit dem entsprechenden FITC-gekoppelten Speziesanti-

* Die Antiseren wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. V. Erfle (Institut für Biologie, GSF, München) zur Verfügung gestellt.

serum inkubiert (1 Std., 37°C), gewaschen und ausgewertet (Zeiss Fluoreszenzmikroskop, Filter: G436, FT510, LP520). Als Kontrollkulturen wurden HF-SSV (SSV-pos.) und L132 (SSV-neg.) stets mitgeführt.

II. Ergebnisse

Die bei dem Einbau und der Biotransformation von ^3H -DMBA in fetalen Hirnzellen während einer 12-tägigen in vitro-Kultivation erhobenen Befunde werden gesondert mitgeteilt (KLEIHUES et al., 1984). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ausschließlich über die bei einer für das ^3H -DMBA-Experiment als Kontrolle dienenden Kultur gemachten Befunderhebungen berichtet werden.

1. Lichtmikroskopie

Wie bereits wiederholt berichtet wurde, setzen sich Hirnzellkulturen im allgemeinen aus verschiedenen Zellpopulationen zusammen, wobei allerdings unter bestimmten Bedingungen die eine oder die andere Zellart vorherrschen kann. Unter den Zelltypen, die aus Hirnexplantaten emigrieren, sind sternförmige bzw. dreieckige Zellen mit feinen, teilweise verzweigten Fortsätzen, fibroblastoide Zellen sowie cytoplasmareiche, flach am Substratum haftende epitheloide Zellen zu nennen.

Die Zellen wachsen als "monolayer", bilden einen dichten Zellrasen und zeigen Kontaktinhibition. Beim Umsetzen der

in den ersten Passagen schnell proliferierenden Zellen wird ein Koloniebildungsvermögen vermißt. Mit zunehmender in vitro-Kultivationsdauer nimmt die Proliferationsgeschwindigkeit ständig ab und die Zellen stellen schließlich ihr Wachstum in der Regel zwischen der 10. und 15. Passage (3-4 Monate) ein.

Bei einer Kultur vom Hirn eines 18 Wochen alten Fetus wurden in der 4. Passage (23 Tage nach der in vitro-Explantation) Transformationsvorgänge beobachtet. Es traten an verschiedenen Stellen des Zellrasens Zellinseln auf, die aus homio-morphen, bi- bzw. multipolaren astrozytenartigen, schnell-proliferierenden Zellen bestanden (Abb. 1). Innerhalb von einigen Tagen wurden die übrigen flachen und breitanhaften Zellen überwuchert und ab der 7. Passage hat sich der astrozytenartige Zelltyp durchgesetzt. Die Wachstumseigenschaften dieser Zellen, wie Proliferationsgeschwindigkeit, Koloniebildungsvermögen etc. sind bislang (180. Passage) konstant geblieben.

Die nach einer Latenzzeit von 10-14 Tagen entstandenen intracerebralen bzw. subkutanen Transplantationstumoren (Abb. 2) zeigen lichtoptisch keine wesentlichen strukturellen Unterschiede. Es handelt sich hierbei um äußerst zellreiche Tumoren, die durch ein recht einheitliches Zellbild gekennzeichnet sind. Im Tumorparenchym wechseln sich Areale mit dicht gelagerten großbleibigen Zellen und Verschleimungs-zonen mit locker angeordneten fortsatzreichen Zellen ab. Eine bestimmte Zellanordnung läßt sich nicht erkennen. Die fortsatzreichen Zellen besitzen rundlich-ovale z.T. bohnenförmige Kerne, die ein zartes Chromatingerüst aufweisen und häufig exzentrisch liegen. In den Verschleimungsarealen finden sich zahlreiche zystenartige Hohlräume, die ein leicht eosinophiles körniges Material enthalten. Auffallend ist das zahlenmäßig hohe Vorkommen von abnormen Mitosefiguren,

sowie das gehäufte Auftreten von riesenzellartigen Bildungen (Abb. 3). Im Tumorparenchym und insbesondere in den peripheren Tumorregionen lassen sich erstaunlich gut erhaltene Strukturen, wie Muskelfasern, Nervenfragmente etc. nachweisen (Abb. 3).

Die Vaskularisation des Tumorparenchyms ist uneinheitlich. Neben schwach vaskularisierten Bezirken mit dünnwandigen, kapillarähnlichen Gefäßen kommen auch Areale vor, die zahlreiche kavernös gestaltete dünnwandige Gefäße aufweisen (Abb. 4).

Sowohl die intracerebralen als auch die subkutanen Transplantationstumoren sind durch ein infiltratives Wachstum gekennzeichnet (Abb. 4). Einbruch und Ausbreitung der intracerebralen Tumoren in das Ventrikelsystem und in den subpialen Raum ist die Regel.

2. "Scanning"-Elektronenmikroskopie

Wie bereits im Interferenzkontrast zu sehen ist, setzt sich die permanente Kultur aus unterschiedlich großen, fortsatzreichen Zellen zusammen, die in der Regel eine raue Oberfläche aufweisen (Abb. 5).

Eine Gemeinsamkeit aller in der Kultur vertretenen Zellformen besteht in der Ausbildung zahlreicher Zelloberflächenspezialisierungen, die sowohl in niedrigen als auch in hohen Passagen nachweisbar sind. Bei starker Vergrößerung erkennt man auf der rauhen, teils zerklüftet wirkenden Oberfläche zahlreiche Mikrovilli. Daneben kommen feine, tentakelartige Cytoplasmafortsätze, die sog. Filopodien, vor. Diese sind in der Nähe des Zelleibes von mehr kolbiger Gestalt und gehen dann häufig nach einer Verzweigung in lange,

haarartig dünne Ausläufer über ("secondary branches"). Die Filopodien haften nicht nur am Substratum, sondern sie enden auch an Oberflächenstrukturen benachbarter Zellen und stellen somit den morphologischen interzellulären Kontakt her. An zahlreichen Stellen zeigen sich stellenweise faltenartige Ausbuchtungen, die Lamellipodien, sowie mehr kolbig bis kugelförmige Auswüchse, die sog. "zeiotic blebs" (Abb. 5).

3. Elektronenmikroskopie

Da sich ultrastrukturell keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen den in vitro und in vivo gezüchteten Tumorzellen nachweisen lassen, erscheint eine zusammenfassende Befunddarstellung zweckmäßig. Die Zellen können eng aneinander liegen und einen geschlossenen Gewebsverband bilden, oder im lockeren Verband formiert sein und von ungeformten Material umgeben sein. Die Tumorzellen besitzen große, rund bis länglich oval geformte Kerne. Die Zelloberfläche ist zumindest streckenweise verhältnismäßig glatt und nur andeutungsweise gewellt. Häufig finden sich an den Cytoplasmamembranen zahlreiche Pinocytosevesikel und tentakelartige Mikrovilli (Abb. 6).

Das Kernmaterial stellt sich als feinkörniges Euchromatin sowie am Kernrand als saumartig kodensiertes Heterochromatin dar. Vereinzelt sind im Karyoplasma sowohl ribosomenähnliche Perichromatingranula als auch kleine Sphäridien vom fibrillären Typ anzutreffen.

Das Cytoplasma der Tumorzellen ist mäßig elektronendicht und enthält in der Regel gut ausgebildetes und über das Perikaryon und die Zellfortsätze regellos verteiltes endoplasmatisches Retikulum. Dieses besteht aus kurzen, in der

Regel nicht erweiterten Zisternen. In der Lichtung der Zisternen ist ein amorphes Material von geringer Elektrodichte zu finden. Auf den Membranen der Zisternen befindet sich ein dünner Besatz von Ribosomen. Freie Ribosomen sind ebenfalls vorhanden und liegen einzeln oder häufiger zu Polysomen angeordnet vor. Die Tumorzellen besitzen eine unterschiedliche Anzahl von weit verstreuten Mitochondrien. Darüber hinaus sind bei einem Teil des Materials aufgetriebene, weitgehend elektronenoptisch leer erscheinende und im wesentlichen artifiziell veränderte Mitochondrien zu sehen (Abb. 6). Der Golgi-Apparat präsentiert sich in den verschiedenen Zellen unterschiedlich entwickelt. Er kann aus einer einzelnen, kernnah gelegenen Serie von abgeplatteten Sacculi bzw. dilatierten Zisternen bestehen. Seltener kann der Golgi-Apparat aus mehreren Feldern bestehen, die das kernnahe Perikaryon durchziehen und die sich nicht nur aus Dictyosomen, sondern auch aus größtenteils glattwandigen Bläschen zusammensetzen. Darüber hinaus sind im Cytoplasma auch einzelne multivesikuläre Körper, tropfenartige Lipideinschlüsse und Phagosomen mit Resten von Organellen oder myelinartigen Figuren zu finden (Abb. 6).

Das Charakteristikum der Tumorzellen ist jedoch ein allgemeiner Reichtum an Filamenten, die im Zelleib mehrdimensional oder parallel angeordnet sind und die Zellfortsätze in kleinen Bündeln längsgerichtet durchziehen. Neben den Filamenten lassen sich auch Mikrotubuli nachweisen. Diese werden vereinzelt und in unmittelbarer Nachbarschaft der Filamente gefunden und können in einzelnen Zellabschnitten bzw. Zellfortsätzen etwas dichter gelagert sein (Abb. 6, 7).

Sowohl in den in vitro gezüchteten Zellen als auch in den Zellen der Transplantationstumoren sind an der Oberfläche knospende ("budding"-Phänomen) virale Strukturen (C-Partikel) zu sehen. Sie können in bestimmten Zellen bzw. Zell-

profilen gänzlich fehlen oder vereinzelt auftreten und in anderen massenhaft vorhanden sein. Im Extrazellulärraum bzw. in den Interzellularspalten der Transplantationstumoren kommen zahlreiche reife C-Partikel mit einem zentral gelagerten, dichten Nucleoid vor. Gleiche Viruspartikel werden auch vereinzelt in intrazellulären Räumen von Tumorzellen beobachtet. Ferner findet man im Extrazellulärraum Virusteilchen, die alle möglichen morphologisch faßbaren Reifungsstadien aufweisen (Abb. 8).

4. Glia-assoziierte Antigene

Zur Charakterisierung der etablierten Kultur wurden als Markerproteine die vornehmlich bei den neuroepithelialen Zellen vorkommenden Antigene (S-100- und GFA-Protein) herangezogen. Beim Nachweis glia-assoziiierter Proteine reagierten zunächst (10. bzw. 15. Passage) sowohl die in vitro transformierten Hirnzellen als auch die daraus abgeleiteten Transplantationstumoren negativ. Allerdings wurde nach einer Kultivationszeit von ca. 6 Monaten (41. Passage) mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz-Technik eine deutliche positive Reaktion für beide Proteine festgestellt. Die fluoreszierenden Strukturen sind bei acetontfixiertem Material sowohl im Cytoplasma als auch an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 1). Bei unfixierten Zellen läßt sich lediglich an der Cytoplasmamembran eine spezifische Fluoreszenz nachweisen.

5. Gliom-assoziierte Antigene

Für die Klärung der Frage nach der möglichen Expression tumor-assoziiierter Antigene bei den in vitro transformierten 79H-G-396-Zellen wurden monoklonale Antikörper, die gegen Astrocytome Grad II des Menschen (BF7, GEZ) und der Ratte (14BC1, 14FC3, 13GC1) sowie gegen Melanome des Menschen (Mel-5, Mel-14) gerichtet sind, eingesetzt.

Die gegen Astrocytome gerichteten monoklonalen Antikörper zeigen sowohl im RIA als auch im micro-ELISA keine deutliche Bindungsaffinität zu den als "targets" verwendeten 79H-G-396-Zellen. Hingegen erkennt ein gegen ein Melanom des Menschen (Mel-5) gerichteter monoklonaler Antikörper Antigendeterminanten auch an 79H-G-396-Zellen. Die für die cytochemische Darstellung von Antigen-Antikörperkomplexen eingesetzte indirekten Immunofluoreszenz- bzw. Immunperoxidase-Test zeigen, daß die 79H-G-396-Kultur lediglich einzelne Zellen enthält, die von monoklonalen Antikörpern erkannt werden können. Die Bindungsstellen liegen ausnahmslos an der Cytoplasmamembran.

6. Dibutyryl-cAMP-(db-cAMP) "Differenzierung"

Lichtoptisch wahrnehmbare Änderungen der Zellmorphie konnten nach Behandlung der Zellen mit 0,1 mM db-cAMP beobachtet werden. Bei Verwendung von 0,1 mM db-cAMP konnte kein Unterschied gegenüber den nicht db-cAMP-behandelten Kontrollpräparaten festgestellt werden. Die Hauptwirkung von 1,0 mM db-cAMP auf die in vitro behandelten Zellen liegt in der Ausbildung zahlreicher Zellfortsätze, sowie in einer erheblichen Zunahme der Dicke und Länge vorhandener Zellfortsätze. Die exzessive Fortsatzbildung geht durchweg mit einer deutlichen Proliferationsdepression und teilweise

auch mit einer Schrumpfung des Cytoplasmasaumes einher. Die ersten morphologisch feststellbaren Zellveränderungen können 12 Stunden nach Zugabe von 1,0 mM db-cAMP zu dem Medium registriert werden. Die Zellen zeigen bereits eine deutliche Ausbildung von Fortsätzen, die in den folgenden 12 Stunden noch erheblich an Länge zunehmen (Abb. 9). Nach 24 Stunden scheint das Maximum der Wirkung erreicht zu sein, denn auch durch erneute Behandlung mit db-cAMP nach diesem Zeitpunkt kommt es zu keinen wesentlichen Veränderungen mehr. Wird das db-cAMP-haltige Medium durch db-cAMP-freies Medium ersetzt, so kommt es allmählich zur Rückbildung der langen Fortsätze und zu einer Zunahme der Proliferationsgeschwindigkeit. Etwa 24 Stunden nach dem Entfernen des db-cAMP-haltigen Mediums wird eine vollständige Erholung der Tumorzellen beobachtet, die durch eine Rückkehr zu der vor der Behandlung herrschenden Verhältnisse dokumentiert wird.

7. Eigenschaften der Viruspartikel

Im Gradienten wurde ein ^3H -Uridin-"peak" bei 41,5% Saccharose festgestellt (Abb. 10). Dies entspricht einer Partikeldichte von 1,18 - 1,19 g/ml. Die Ergebnisse des Immunofluoreszenz-Testes sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Reaktivität von Seren gegen verschiedene Viren
bzw. Virusantigene mit virushaltigen 79H-G-396-
Zellen

Antikörper	Konjugat	Reaktion
1. r-a SSV p30		++
2. r-a SSV gp70		(+)
3. r-a SSV ges.	gar-FITC (1-5)	++
4. r-a MuLV p30		-
5. r-a BEV p28		-
6. g-a HTLV p24	rag-FITC	-
7. m-a HTLV p19	ram-FITC	-
8. h-HS (Kontrolle)	rah-FITC	(+)
9. r-NRS (Kontrolle)	gar-FITC	-

(SSV: "simian sarcoma virus", NRS: "normal rabbit serum",
MuLV: "murine leukemia virus", BEV: "baboon endogenous virus",
HTLV: "human T-cell leukemia virus", HS: human serum,
NRS: normal rabbit serum)

Die Ergebnisse der Immunofluoreszenz, die durch mitgeführte
Kontrollkulturen (SSV-pos. bzw. SSV-neg. Zellen) verifiziert
sind, zeigen eine deutliche Reaktion der virushaltigen
79H-G-396-Zellen mit gegen SSV gerichtetes Antiserum.



Abb. 1: "Spontane" in vitro Transformation fetaler Hirnzellen des Menschen. Einzelne Transformationsinseln in der 4. Passage (a, b, c). Die permanente Kultur setzt sich aus bi- bzw. multipolaren Zellen zusammen (d, 70. P.), die durchweg bei dem immuncytochemischen S-100-Protein-nachweis positiv reagieren (e, f). (a-c: Phasenkontrast, x 160; d: HE-Fbg., x 120; e, f: Immunofluoreszenz, x 300 bzw. x 180)

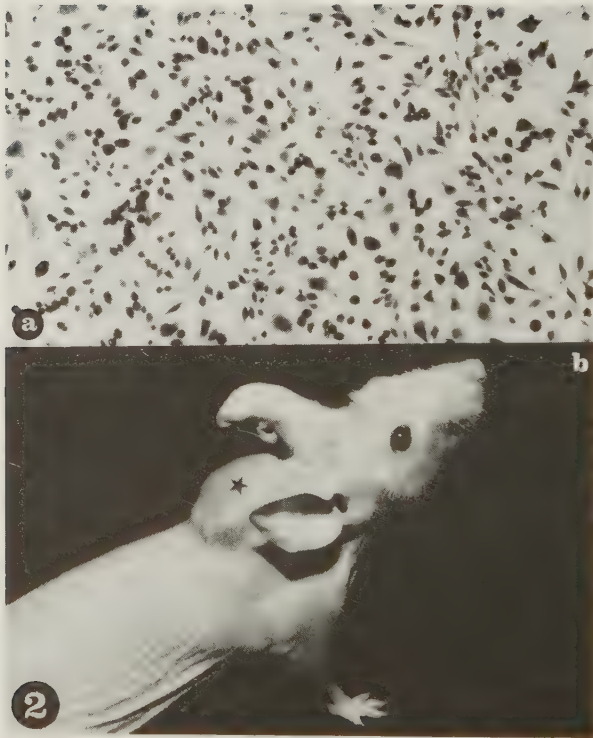


Abb. 2: Nach der s.c. Inoculation von 5×10^6 Zellen der 92. Passage (a) entstandener Transplantationstumor (b).
(a: HE-Fbg., x 120)

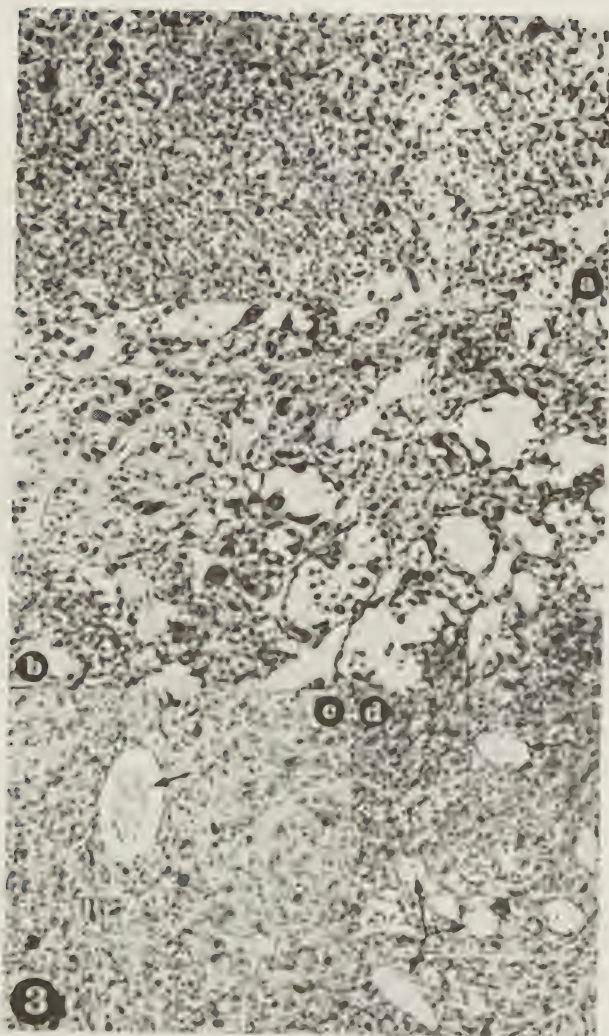


Abb. 3. Subkutaner Transplantationstumor mit zellreichen Arealen (a) sowie Verschleimungszonen mit locker angeordneten Zellen und zahlreichen cystenartigen Hohlräumen (b). Im Tumorparenchym lassen sich noch gut erhaltene präexistente Strukturen, wie Nerven (c, $\nearrow$), Muskelfasern (d, $\nearrow$) etc. nachweisen.
(a-d: HE-Fbg., x 200)

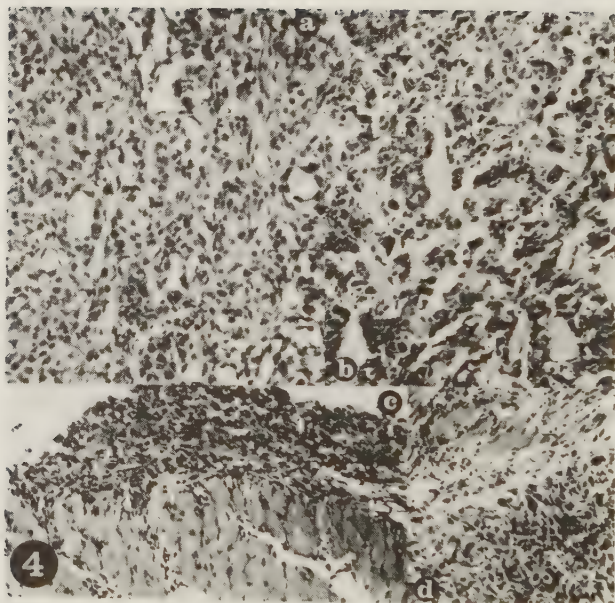


Abb. 4: Intracerebraler Transplantationstumor mit fortsatzreichen Zellen (a) und stellenweise üppiger Vascularisation (b). Subkutaner Transplantationstumor (c-d), der benachbarte Strukturen in breiter Front infiltriert.
(a-d: HE-Fbg., a-b: x 200; c-d: x 120)



Abb. 5: In vitro kultivierte Tumorzellen (90. P.), die zahlreiche Fortsätze und eine raue Oberfläche aufweisen (a). Rasterelektronenmikroskopische Darstellung (b-d) der gleichen Zellen (96. P.), die zahlreiche Mikrovilli und Filopodien sowie einzelne "zeiotic blebs" zeigen.
(a: Nomarski Interferenzkontrast, x 340; b: x 300; c: x 900; d: x 5400)

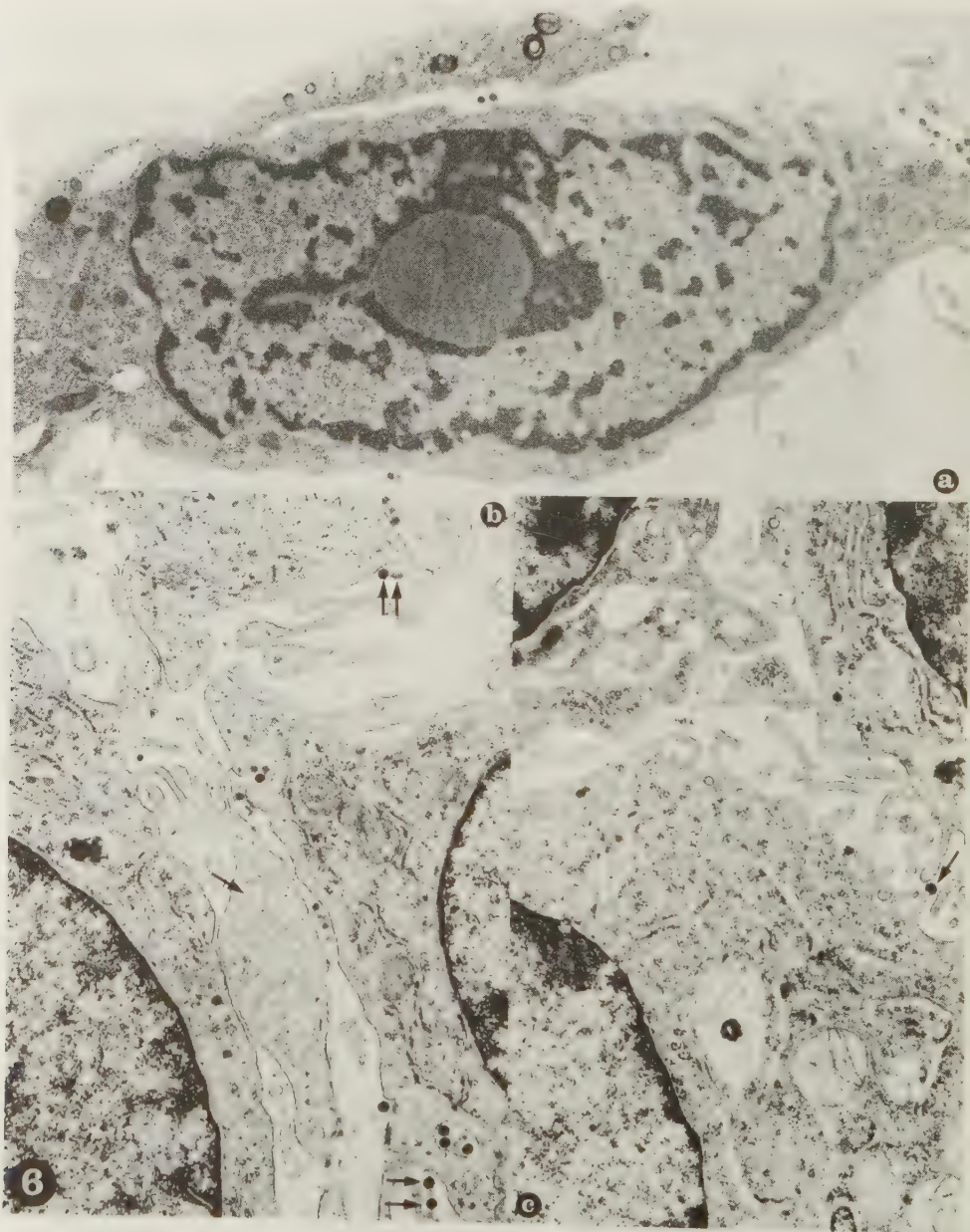


Abb. 6: Elektronenmikrographie einer Zelle (51. P.) mit langgestrecktem Kern, großem Nucleolus, schalem Cytoplasma und relativ glatter Zelloberfläche (a). Die Tumorzellen eines Transplantationstumors (b, c) zeigen u.a. auch Zellfortsätze, die zahlreiche quergeschnittene Filamente und einige Tubuli enthalten (b, $\uparrow$) sowie extrazellulär (b, $\uparrow\uparrow$) bzw. intrazellulär (c, $\uparrow$) liegende C-Partikel.
(a: x 8000; b-c: x 18000)



Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Tumorzellen eines Transplantattumors, die massenhaft gebündelte Filamente enthalten (↑). Das Cytoplasma ist sonst elektronendicht und organellenreich. (x 30.000)

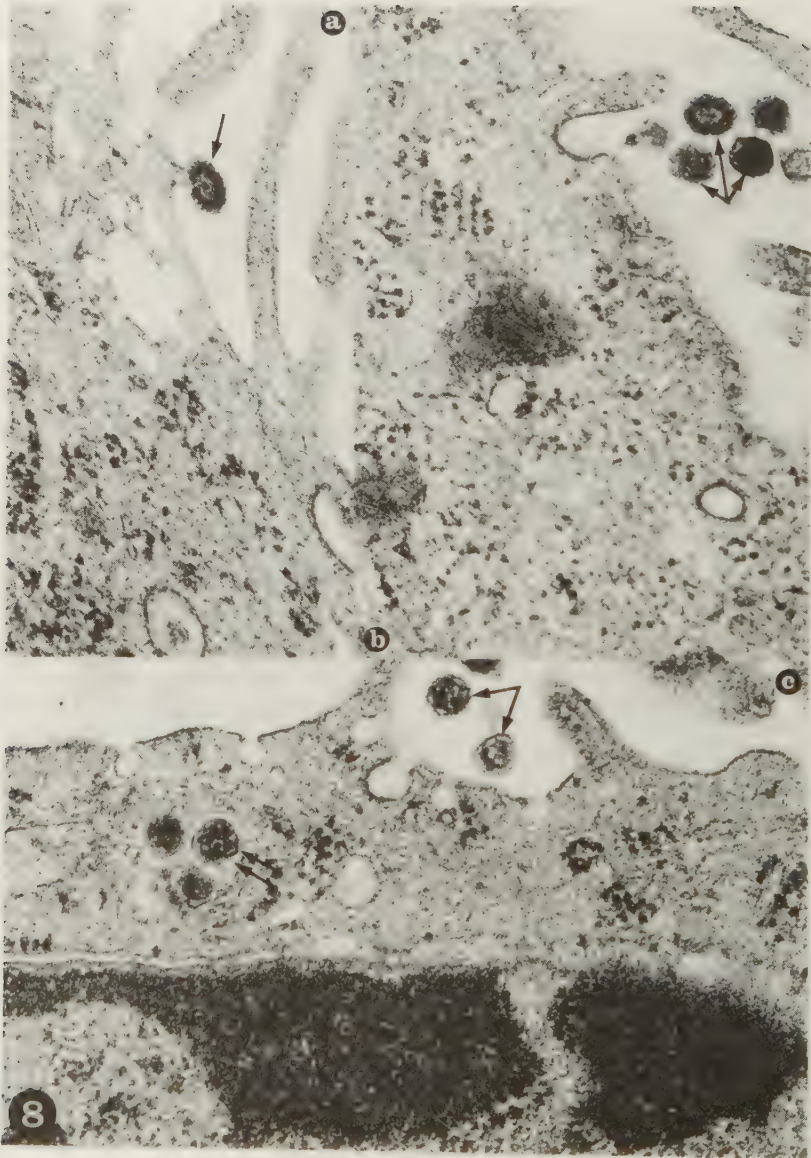


Abb. 8: Elektronenmikrographien von drei verschiedenen in vitro kultivierten Tumorzellen (50. P.). Absprossende C-Partikel (a, ↗), extrazellulär liegende Viruspartikel verschiedener Reifungsgrade (b, ↗) und intrazellulär (c, ↗) bzw. extrazellulär (c, ↗) liegende Oncornaviren. (x 90.000)



Abb. 9: db-cAMP-"Differenzierung". 79H-G-396-Zellen (130. P.) ohne db-cAMP (a) und 12 h (b) bzw. 24 h (c) nach der db-cAMP-Behandlung. Die behandelten Zellen zeigen eine ausgeprägte Fortsatzbildung, die mit einer deutlichen Proliferationsdepression und einer Schmälerung des Cytoplasmas einhergeht.
(a-c: HE-Fbg., x 200)

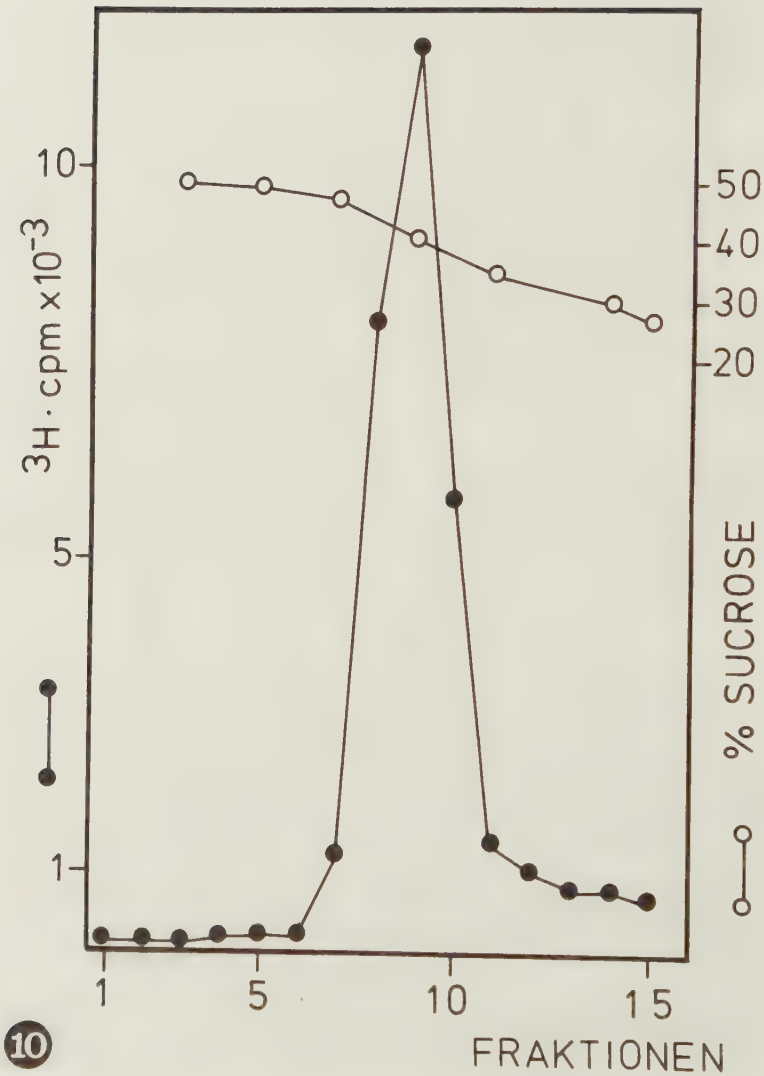


Abb. 10: Anreicherung von ^3H -Uridin markierter Viruspartikel in einem linearen Saccharose-Gradienten. Die höchste Radioaktivität findet sich bei 41,5% Saccharose und dies entspricht einer Partikeldichte von 1,18-1,19 g/ml.

E. DISKUSSION

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, daß offensichtlich unter bestimmten Bedingungen eine "spontane" in vitro-Transformation diploider Hirnzellen des Menschen möglich ist. Dies ist von besonderem Interesse, zumal allgemein akzeptiert ist, daß in der Regel normale Mammalia-Zellen in vitro, möglicherweise infolge des Zellalterungsprozesses unter in vitro-Bedingungen, eine beschränkte Lebensdauer aufweisen.

Unter den hier beschriebenen Kultivationsbedingungen sind fetale Hirnzellen des Menschen in den ersten in vitro-Passagen durch eine hohe Proliferationsgeschwindigkeit gekennzeichnet. Allerdings nimmt die anfängliche Vermehrungsfähigkeit, die eine hohe Teilungsrate (1:10 - 1:20) ermöglicht, etwa ab der 4. Woche der in vitro-Kultivation (5. Passage) deutlich ab, so daß die Zellen danach nur in hoher Dichte 1:2 gesplittet werden können. Nach der 10. Passage treten die Zellen in eine mehr oder weniger stationäre Phase über, um etwa nach einer 3-monatigen Kultivationszeit ihr Wachstum völlig einzustellen. Diese Beobachtungen zeigen, daß fetale Hirnzellen des Menschen als biologisches in vitro-Testsystem nur eine kurze Zeit verwendet werden können. Transformierte Zellen hingegen stehen als permanent propagierbare Zellen, zumindest für bestimmte Untersuchungen, unbeschränkt zur Verfügung.

Bei der Etablierung von in vitro-Testsystemen humanen Ursprungs für die Untersuchung von Gesundheitsrisiken, die für den Menschen aus Umweltchemikalien erwachsen könnten, darf die Möglichkeit einer "spontanen" Transformation kultivierter Zellen nicht unberücksichtigt bleiben.

Obgleich die näheren Umstände, bzw. die Ursache für die beschriebene Transformation fetaler Hirnzellen unbekannt bleiben, ist es bemerkenswert, daß der Transformationsprozeß un-

gewöhnlich früh eingesetzt hat (4. Passage, 23. Kultivations-tag). Die in vitro bislang beobachtete "spontane" Transformation von Leberzellen der Ratte (WEINSTEIN et al., 1975; KARASAKI et al., 1976) und embryonalen bzw. fetalen Hamsterzellen (PAPADOPOULOU et al., 1977; BARRETT, 1980) erfolgte bei Langzeitkulturen, d.h. nach einer Kultivationsdauer von mehr als 6 Monaten.

Beim Vergleich der Tumorigenitätseigenschaften verschiedener "spontan" transformierter Zellarten zeigen sich erhebliche Unterschiede. Bei Epithelzellen aus der Leber neugeborener Ratten und embryonalen Hamsterzellen können mehrere Stadien der neoplastischen Umwandlung unterschieden werden (MOREL-CHANY et al., 1978; BARRETT, 1980). Dabei zeigen diese Zellen zunächst Transformationszeichen, wie Änderungen der Morphologie, des in vitro-Wachstumsverhaltens etc. und wesentlich später sind die transformierten Zellen in der Lage, in vivo-Transplantationstumoren zu bilden. Die hier beschriebene Zelllinie hingegen zeigte bereits in der 15. Passage - in der sie das erste Mal getestet wurde - tumorogene Eigenschaften. Die s.c. Inoculation von 5×10^6 79H-G-396-Zellen bei immundefizienten Balb/c Mäusen führte nämlich nach einer Latenzzeit von 2-3 Wochen zur Entstehung von Transplantationstumoren. Dies deutet darauf hin, daß bei dieser Zelllinie nicht eine stufenweise Umwandlung, sondern von Anfang an eine maligne Transformation erfolgte.

Besondere Beachtung verdient die Beobachtung hinsichtlich des Verhaltens der 79H-G-396-Zellen bei der Expression des S-100-Antigens, ein Protein, das bei den meisten neuroepithelialen Zellen und vornehmlich bei Gliazellen vorkommt.

Die Überprüfung der Synthese des S-100-Proteins nach erfolgreicher Etablierung der transformierten Zellen (10. Passage) verlief nämlich negativ. Ähnliche Befunde konnten auch beim Nachweis von GFAP (15. Passage) erhoben werden. Bei erneuter

Durchführung der Nachweistests für glia-assoziierte Antigene nach einer in vitro-Kultivationsdauer von etwa 6 Monaten erwiesen sich die Zellen für beide Proteine als positiv. Aufgrund fehlender Verlaufsuntersuchungen können allerdings keine Angaben über den Zeitpunkt der in vitro-Aufnahme der Produktion von Glia-Antigenen gemacht werden.

Über die Expression von S-100-Protein während der pränatalen Hirnentwicklung beim Menschen gibt es lediglich einzelne Angaben. Mit Hilfe des micro-Komplementfixations-Testes konnten in verschiedenen Hirnregionen zwischen der 15. - 30. Gestationswoche eben noch nachweisbare S-100-Proteinkonzentrationen gemessen werden (ZUCKERMAN et al., 1970). Detaillierte Befunde über die S-100-Antigenexpression während der pränatalen und postnatalen Hirnentwicklung wurden hingegen bei verschiedenen Tierspezies (Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Kücken, etc.) erhoben. Bei der Maus (CICERO et al., 1972) und der Ratte (HERSCHMAN et al., 1971) konnte erst während der perinatalen Phase S-100-Antigen nachgewiesen werden. Beim tectum opticum des Kückens wurden bis unmittelbar vor dem Schlüpfen sehr niedrige S-100-Konzentrationen gemessen. Nach dem Schlüpfen jedoch steigt die S-100-Menge rasch an, so daß nach 3-5 Wochen die Werte ihren Höchststand erreichen, um danach konstant zu bleiben.

Obgleich in den verschiedenen Regionen des Hirns unterschiedliche S-100-Proteinkonzentrationen enthalten sind, wurde im allgemeinen festgestellt, daß während der postnatalen Entwicklung von Maus und Ratte es zu einer stetigen Zunahme der S-100-Menge bis zu einem Alter von 6 Monaten kommt und sie danach konstant bleibt (Lit. bei ZOMZELY-NEURATH und WALKER, 1980). Der Verlauf der Expression von S-100-Protein während der postnatalen Periode beim Menschen unterscheidet sich offenbar grundsätzlich von jenem bei Nagern. Wie von MOORE und PEREZ (1968) betont wird, kommt es im Hirn des Menschen

zu einer linearen Zunahme des S-100-Proteins vom 2. Lebensjahr an bis zum Alter von 80 Jahren, woraus eine Verdreifachung des Wertes resultiert.

Die quantitative Bestimmung des GFA-Proteins während der Ontogenese bei der Maus hat ergeben, daß dieses Protein zwischen dem 10. und 14. Tag postnatal im Hirn nachweisbar ist. Dieser Befund steht in direkter Beziehung zum Einsetzen der astroglialen Differenzierung während dieser Zeit der Myelinisierung (JAQUE et al., 1976).

Unter Berücksichtigung der hier kurz referierten Befunde über die Expression hirnspezifischer Antigene während der prä- bzw. postnatalen Entwicklung des Hirns dürfte die Annahme berechtigt sein, daß auch bei Menschen während der embryonalen bzw. frühfetalen Phase keine nachweisbaren Mengen von Glia-Antigenen exprimiert werden. Dies dürfte die anfängliche Negativität der in vitro transformierten Hirnzellen beim Nachweis von S-100- und GFA-Protein erklären. Nach einer in vitro-Kultivationszeit von mehreren Monaten kommt es jedoch, ähnlich wie bei der in vivo-Differenzierung, zu einer Expression gliaspezifischer Antigene.

Die Herkunft von Typ C-Viruspartikeln in den transformierten Zellen, erstmalig in der 7. Passage nachgewiesen, kann man sich aufgrund der bislang vorliegenden Ergebnisse nicht mit Sicherheit erklären. Eine Infektion der in vitro gezüchteten Hirnzellen via FBS scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, da Parallelkulturen, die mit demselben Serum behandelt wurden, keine Viruspartikel produzierten.

Typ A- und Typ C-Viruspartikel wurden sowohl bei spontan transformierten Leberzellen der Ratte als auch bei chemisch induzierten Rattenhepatomzellen nachgewiesen (WEINSTEIN et al., 1975; KARASAKI et al., 1976). Hingegen konnten bei normalen Leberzellkulturen, die aus der Leber adulter Ratten verschiedener Stämme angelegt wurden - zumindest elektronenmikroskopisch - keine Viruspartikel dargestellt werden (WEINSTEIN et al., 1975).

Auf die Verbindung von Oncorna-Viren mit einer ganzen Reihe spontaner und chemisch induzierter Tumoren verschiedener Organe, einschließlich des Nervensystems (ANZIL et al., 1978), wurde wiederholt hingewiesen (Lit. bei WEINSTEIN et al., 1975). Allerdings steht eine allgemein verbindliche Beschreibung der biologischen Funktion dieser Partikel und insbesondere ihrer Rolle während der Zelltransformation noch aus.

Die bei der morphologischen und insbesondere bei der immunologischen Charakterisierung der von den 79H-G-396-Zellen produzierten Viruspartikel erhobenen Befunde, legen den Schluß nahe, daß es sich hierbei um Typ C RNA-Viruspartikel handelt. Darüber hinaus scheinen diese Partikel Antigene zu enthalten, die mit Antiseren gegen SSV bzw. SSV-Komponenten reagieren.

Aufgrund seroepidemiologischer Untersuchungen wurde eine weitverbreitete Infektion gesunder Personen mit Primaten-Typ C-Viren angenommen (Lit. bei GERARD und GREEN, 1978). Diese Befunde konnten allerdings durch weitere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Durch die Anwendung des gereinigten Strukturproteins (p30) bzw. Glycoproteins (gp 69/71) des Primatenvirus Typ C konnten nämlich im Serum gesunder Menschen keine entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden (STEPHENSON und AARONSON, 1976). Dessen ungeachtet konnte durch morphologische Untersuchungen gezeigt werden, daß Oncorna-Viruspartikel Typ C in der Placenta des Menschen vorkommen (KALTER et al., 1973). Desweiteren konnten Typ C-Virusinformationen in embryonalen Fibroblasten und in Spermien des Menschen nachgewiesen werden. Ferner konnte durch Hybridisierungsexperimente gezeigt werden, daß die embryonalen Fibroblasten des Menschen HEL-12 provirale DNA-Sequenzen enthalten, die sehr ähnlich der SSV-Sequenzen sind. Aus der Tatsache, daß normalerweise Zellen humanen Ursprungs keine SSV-Sequenzen enthalten, wurde geschlossen, daß die HEL-12-Zellen exogen mit SSV-Virus infiziert wurden (Lit. bei

GERARD und GREEN, 1978). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Glioblastome des Menschen sis-Transcripte (sis ist das Onkogen des SSV) enthalten, die jedoch in Carcinom-, Melanom- und Lymphomzellen und in normalen Fibroblasten nicht nachweisbar waren (EVA et al., 1982).

Mit Hilfe von RNA-Tumurviren können bei verschiedenen Spezies ein breites Spektrum von Neubildungen, darunter auch Hirntumoren, induziert werden. Aus dem Genom dieser Viren wurden Sequenzen isoliert, die in der Lage sind, geeignete Empfängerzellen in vitro zu transformieren. Diese viralen Onkogene (v-onc) sind kein essentieller Bestandteil des retroviralen Genoms, sondern sie wurden offensichtlich durch Rekombination aus Vertebraten übernommen (PITTS et al., 1983). Die zellulären Äquivalente dieser Gene (c-onc) gehören zum Genbestand jeder normalen Zelle und sollen bei der Entstehung nicht virus-induzierter Tumoren beteiligt sein.

Unter Berücksichtigung der referierten Ergebnisse und der Tatsachen, daß in Tumorzellen humanen Ursprungs den retroviralen Onkogenen analoge Informationen enthalten sind, wäre eine endogene Typ C-Virusproduktion bei den maligne transformierten Hirnzellen durchaus denkbar. Als eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Vorhandensein von Viruspartikeln in den 79H-G-396-Zellen käme eine im Uterus stattgefundene Infektion in Betracht, zumal Typ C-Partikel in normalen Placentas des Menschen nachgewiesen wurden (KALTER et al., 1973). Eine Beteiligung dieser Viruspartikel bei der Transformation der 79H-G-396-Zellen erscheint allerdings nicht sehr wahrscheinlich.

Unter Zugrundelegung der morphologischen und immunocytochemischen Befunde kann festgestellt werden, daß es sich bei der durch "spontane" Transformation entstandenen Tumorkultur um eine maligne Gliomlinie astrocytären Charakters handelt. Für diese Annahme sprechen das in vitro-Verhalten der Zellen in Verbindung mit den von ihnen ex-

primierten glia-assoziierten Antigenen und ihrem mehr oder weniger ausgeprägten Gehalt an filamentären Strukturen (Abb. 1, 7). Intermediäre Filamente kommen allerdings nicht nur bei Astrocyten bzw. Astrocytomzellen vor, sondern sie stellen Strukturbestandteile einer ganzen Reihe von Zellen dar. Obgleich die intermediären Filamente bei allen Zellarten ähnlich strukturiert sind, unterscheiden sie sich doch durch ihre biochemischen und immunologischen Eigenschaften (DAVISON, 1981). So sind die bei Glia- bzw. Gliomzellen vorkommenden intermediären Filamente, die bei astrocytären Zellen besonders reichlich vertreten sind, durch den Gehalt von GFA-Protein gekennzeichnet.

Beim Nachweis tumorassoziiierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper gegen Melanomzellen des Menschen konnte gezeigt werden, daß zu einer bestimmten Zeit nicht mehr als 10% der 79H-G-396-Zellen eine positive Reaktion zeigten. Dieser Befund weist darauf hin, daß (a) bei Gliomen und Melanomen gemeinsame bzw. kreuzreagierende Antigene ausgedrückt werden - ähnliche Ergebnisse wurden von CARRELL et al. (1982) mitgeteilt - und (b) die 79H-G-396-Kultur aus unterschiedlichen Zellpopulationen sich zusammensetzt.

Auf die Koexistenz verschiedener Zellklone innerhalb eines neurogenen Tumors, die sich wahrscheinlich während der Tumorprogression ändern kann, wurde wiederholt hingewiesen (YEH et al., 1981; STAVROU et al., 1983). Die Heterogenität neurogener Tumoren, die u.a. für die Entwicklung immunologischer Techniken und vor allem für den klinischen Einsatz von Radiochemikalien, Immunotoxinen etc. von besonderer Bedeutung ist, könnte auf divergierende Zellzyklusphasen oder unterschiedlichen Differenzierungsgrad der blastomatisierten Zellen beruhen. Wahrscheinlich aber steigt bei progressivem Gliomwachstum die Anzahl heterogener Subpopulationen durch eine erhöhte Rate von

Spontanmutationen, woraus somit eine genetisch bedingte klonale Variabilität resultiert. Aggressive Klone ohne immunogene Eigenschaften werden durch den im Zuge immunologischer Abwehrmaßnahmen, Stoffwechselbedingungen, Manipulationen etc. erzeugten Selektionsdruck begünstigt und können in der Tumormasse, zumindest temporär, dominieren. Die intratumorale antigene Diversität neurogener Tumoren, die auch bei der akuten myeloischen Leukämie des Menschen beobachtet wurde (OLSSON und MATHE, 1981), könnte jedoch durch den Einsatz von Immunglobulin-"cocktails" mit definierten Spezifitäten begegnet werden.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In der 4. Passage einer Kultur des Großhirns eines 18-wöchigen Fetus, d.h. 23 Tage nach der Primärkultivation, wurden einzelne umschriebene Kolonien transformierter Zellen beobachtet. Bei der 7. in vitro-Passage bestand die gesamte Population dieser Zellkultur aus schnell wachsenden fortsatzreichen Elementen, deren Morphe und Proliferationseigenschaften bislang unverändert geblieben sind.

In Balb c/nu nu Mäusen subkutan bzw. intracerebral transplantierte Zellen (5×10^6 bzw. 1×10^6) verschiedener Passagen führte nach einer Latenzzeit von etwa 2 Wochen zu Tumorstadium. Ultrastrukturell fanden sich zahlreiche intermediäre Filamente und vom Plasmalemm aussprossende bzw. im Extrazellulärraum liegende Viruspartikel. Diese Befunde konnten sowohl in transformierten Zellen, die ausschließlich in vitro kultiviert wurden, als auch in Tumorzellen der in vivo entstandenen Transplantationstumoren erhoben werden. Beim Nachweis gliaspezifischer Antigene (S-100-, GFA-Protein) reagierten zunächst (10. bzw. 15. Passage) sowohl die in vitro transformierten Hirnzellen als auch die Tumorzellen der daraus abgeleiteten Transplantationstumoren negativ. Nach einer Kultivationszeit von ca. 6 Monaten, und zwar in der 41. in vitro-Passage, erwiesen sich die Zellen hingegen durchweg für beide Proteine positiv. Aus den vorliegenden Befunden kann geschlossen werden, daß es sich hierbei um eine Gliomzelllinie astrocytärer Natur handelt, die durch "spontane" Transformation von kurzzeitig in vitro kultivierten fetalen Hirnzellen entstanden ist. Bei der elektronenmikroskopischen und immunologischen Charakterisierung der von den Tumorzellen produzierten Partikeln konnten Evidenzen für das Vorliegen von Oncornaviren Typ C, die mit gegen SSV-gerichtete Antikörper reagieren,

gewonnen werden. Die Untersuchung zur Expression gliom-assoziiierter Antigene, definiert mittels monoklonaler Antikörper, ergab das Vorliegen heterogener Zellpopulationen mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften. Die Koexistenz verschiedener Klone innerhalb einer Gliomkultur könnte Ausdruck einer genetisch determinierten klonalen Variation oder einer unterschiedlichen Differenzierung blastomatisierter Zellen sein.

G. LITERATUR

- ANZIL, A.P., STAVROU, D., BLINZINGER, K.: C-type virus particles in the cell culture of a chemically induced glioma in rats of Sprague-Dawley line.
Vopr. Oncol. 24, 30-32 (1978)
- BARRETT, J.C.: A preneoplastic stage in the spontaneous neoplastic transformation of syrian hamster embryo cells in culture.
Cancer Res. 40, 91-94 (1980)
- BENEDICT, W.F., JONES, P.A., LAUG, W.E., IGEL, H.J., FREEMAN, A.E.: Characterization of human cells transformed in vitro by urethane.
Nature 256, 322-324 (1975)
- BERWALD, Y., SACHS, L.: In vitro cell transformation with chemical carcinogens.
Nature 200, 1182-1184 (1963)
- BERWALD, Y., SACHS, L.: In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons.
J. Natl. Cancer Inst. 35, 641-661 (1965)
- BIGNER, D.D., ODOM, G.L., MAHALEY, M.S., DAY, E.D.: Brain tumors induced in dogs by the Schmidt-Ruppin strain on Rous sarcoma virus. Neuropathological and immunological observations.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 28, 648-680 (1969)
- BIGNER, D.D., SWENBERG, J.A.: Experimental tumors of the central nervous system. Upjohn Company, Kalamazoo 1977
- CARREL, S., de TRIBOLET, N., MACH, J.P.: Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas, gliomas, and neuroblastomas.
Acta Neuropathol. (Berl.) 57, 158-164 (1982)

- CHEN, T.T., MEALEY, J., CAMPBELL, R.L.: Quantitation cloning of malignant human glioma cells by conditional medium. J. Natl. Cancer Inst. 55, 1275-1280 (1975)
- CICERO, T.J., FERENDILLI, J.A., SUNTZEFF, V., MOORE, B.W.: Regional changes in CNS levels of the S-100 and 14.3.2 proteins during development and aging of the mouse. J. Neurochem. 19, 2119-2125 (1972)
- COONS, A.H.: The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658-662 (1957)
- DARAI, G., MUNK, K.: Neoplastic transformation of rat embryo cells with herpes simplex virus. Int. J. Cancer 18, 469-481 (1976)
- DAVISON, P.F.: Intermediate filaments: intracellular diversities and interspecies homologies. In: SCHWEIGER, H.G. (Ed.), International cell biology. Springer-Verlag, Berlin, 1981
- DEINHARDT, F.: Neoplasms induced by Rous sarcoma virus in new world monkeys. Nature 210, 443 (1966)
- DEINHARDT, F., WOLFE, L., NORTHROP, R., MARCZYNSKA, B., OGDEN, J., McDONALD, R., FALK, L., SHARMEK, G., SMITH, R., DEINHARDT, J.: Induction of neoplasms by viruses in marmoset monkeys. J. Med. Primatol. 1, 29-50 (1972)
- EVA, A., ROBBINS, K.C., ANDERSEN, P.C., SRINIVASAN, A., TRONICK, S.R., REDDY, E.P., ELLMORE, N.W., GALEN, A.T., LAUTENBERGER, J.A., PAPAS, T.S., WESTIN, E.H., WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C., AARONSON, S.A.: Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. Nature 295, 116-119 (1982)

- GERARD, G.F., GREEN, M.: Do normal human cells express RNA tumor virus-related information?
Prog. exp. Tumor Res. 22, 250-269 (1978)
- HAYFLICK, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.
Exp. Cell Res. 37, 614-636 (1965)
- HEIDELBERGER, C.: Chemical oncogenesis in culture.
Advan. Cancer Res. 18, 317-366 (1973)
- HERBST, A.L., ULFELDER, H., POSKANZER, D.C.: Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young woman.
N. Engl. J. Med. 284, 878-881 (1971)
- HERSCHMAN, H.R., LEVINE, L., de VELLIS, J.: Appearance of a brain specific antigen (S-100 protein) in the developing rat brain.
J. Neurochem. 18, 629-633 (1971)
- HUEBNER, R.J., WALLACE, P.R., LANE, W.T.: Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 2051-2058 (1962)
- JÄNISCH, W., HORN, K.H., SCHOLTZE, P., SCHREIBER, D.:
Versuche zur Induktion von Hirngeschwülsten bei neugeborenen Rhesus-Affen durch intrazerebrale Injektion von Rous-Viren.
Exp. Path. (Jena) 2, 226-235 (1968)
- JÄNISCH, W., SCHREIBER, D.: Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems. G. Fischer, Jena, 1969
- JAQUE, C.M., JORGENSEN, O.S., BAUMANN, N.A., BOCK, E.:
Brain-specific antigens in the quaking mouse during ontogeny.
J. Neurochem. 27, 905-909 (1976)

- KARASAKI, S., SIMARAD, A., de LAMIRANDE, G.: Ultrastructural analysis of malignant conversion in vitro of epithelial cells derived from normal adult rat liver.
Europ. J. Cancer 12, 527-534 (1976)
- KAKUNAGA, T.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1334-1338 (1978)
- KALTER, S.S., HELMKE, R.J., HEBERLING, R.L., PANIGEL, M., FOWLER, A.K., STRICKLAND, J.E., HELLMAN, A.: C-type particles in normal human placentas.
J. Natl. Cancer Inst. 50, 1081-1084 (1973)
- KLEIHUES, P., LANTOS, P.L., MAGEE, P.N.: Chemical carcinogenesis in the nervous system.
Int. Rev. Exp. Pathol. 15, 153-232 (1976)
- KLEIHUES, P., STAVROU, D.: Reaction of 7,12-dimethylbenz (a)anthracene with DNA of human fetal brain cells in vitro. (In Vorbereitung)
- KOESTNER, A., SWENBERG, J.A., WECHSLER, W.: Experimental tumours of the nervous system induced by resorptive N-nitrosourea compounds.
Prog. Exp. Tumor Res. 17, 9-30 (1972)
- KUMMER, U., THIEL, E., DOXIADES, I., EULITZ, M., STADOLJEV, S., THIERFELDER, S.: Tritium radiolabeling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl (2,3-³H) porprionate: Use in detecting monoclonal antibodies.
J. Immunol. Methods 42, 367-374 (1981)
- LAERUM, O.D., RAJEWSKY, M.F.: Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 1177-1187 (1975)
- LIEBER, M.M., BENVENISTE, R.E., LIVINGSTON, D.M., TODARO, G.J.: Mammalian cells in culture frequently release typ C viruses.
Science 182, 56-58 (1973)

- MARKOVITS, P., COPPEY, J., PAPADOPOULO, D., MAZABRAUD, A.,
HUBERT-HABART, M.: Transformation maligne de
cellules d'embryon de hamster en culture par la
dyméthyl-7,10 benzo(c)acridine.
Int. J. Cancer 14, 215-225 (1974)
- MARKOVITS, P., DAUDEL, P., PAPADOPOULO, D., MAZABRAUD, A.,
HUBERT-HABART, M.: Sur la cancérisation chimique
de cellules d'embryon de hamster en culture de masse.
Bull. Cancer 62, 59-72 (1975)
- MARKOVITS, P., LEVY, S., NOCENTINI, S., MAZABRAUD, A.,
VELIZAROV, A., SABHARWAL, S., BENDA, P.: Transfor-
mation maligne in vitro de cellules de cerveau foetal
de hamster par le benzo(a)pyrène.
C.R. Acad. Sc. Paris 282, 2015-2020 (1976)
- MARKOVITS, P., LEVY, S., PAPADOPOULO, D., NOCENTINI, S.,
TRIPPIER, M.F., BENDA, P.: Transformation maligne in
vitro de cellules de cerveau foetal de hamster par la
méthylnitrosourée.
C.R. Acad. Sc. Paris 285, 623-626 (1977)
- MARKOVITS, P., MAUNOURY, R., TRIPIER, M.F., COULOMB, B.,
LÉVY, S., PAPADOPOULO, D., VEDRENNE, C., BENDA, P.:
Normal and benzo(a)pyrene-transformed fetal mouse brain
cells. I. Tumorigenicity and immunochemical detection
of glial fibrillary acidic protein.
Acta Neuropathol. (Berl.) 47, 197-203 (1979)
- DeMICCO, C., TRIPIER, M.F., HASSOUN, J., LIPCEY, C., MEYER, G.,
TOGA, M.: Neoplastic transformation of hamster brain
cells in vitro by polyoma virus.
Int. J. Cancer 21, 516-522 (1978)
- MONTAGNIER, L., MACPHERSON, I., JARRETT, O.: An epitheloid
variant of the BHK 21 hamster fibroblast line and
its transformation by polyoma virus.
J. Natl. Cancer Inst. 36, 503-512 (1966)

- MOORE, B.W., PEREZ, V.J.: Specific acidic proteins of the nervous system. In: CARLSSON, F.D. (Ed.) Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NY, 1968
- MOREL-CHANY, E., GUILLOUZO, Ch., TRIGAL, G., SZAJNERT, M.-F.: "Spontaneous" neoplastic transformation in vitro of epithelial cell strains of rat liver: Cytology, growth and enzymatic activities.
Europ. J. Cancer 14, 1341-1352 (1978)
- De MURALT, B., de TRIBOLET, N., DISERENS, A.-C., STAVROU, D., MACH, J.P., CARREL, S.: Phenotyping of 60 cultured human gliomas and 34 other neuroectodermal tumors by means of monoclonal antibodies against glioma, melanoma and HLA-DR antigens.
Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 1984 (in press)
- NAPALKOV, N.P., ALEXADROV, V.A.: Effect of 7,12-dimethylbenz (a)anthracene in transplacental carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 52, 1365-1366 (1974)
- NEXØ, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzym-couplet antibodies.
Virology 77, 849-852 (1977)
- OLSSON, L., MATHE, G.: Antigenic heterogeneity of leukemia blood cells.
Blood Cells 7, 281-286 (1981)
- ONVORA, L.O.: Early stages of experimental brain tumors in the rat. Thesis, Universität Leipzig, 1973
- PAPADOPOULOU, D., LEVY, S., CHAMAILARD, L., BEESAU, O., HUBERT-HABART, m., MARKOVITS, P.: Hamster cells, untreated and treated with chemical carcinogens, maintained in vitro for 2 1/2 years.
Br. J. Cancer 36, 65-71 (1977)
- PATERAKI, E., GUESDON, J.L., SERRIE, C., AVRAMEAS, S.: Ter-ELISA: The ELISA-test performed in terasaki plates.
J. Immunol. Methods 46, 361-368 (1981)

- PITTS, O.M., POWERS, J.A., HOFFMAN, P.M.: Vascular neoplasms induced in rodent central nervous system by murine sarcoma viruses.
Lab. Invest. 49, 171-182 (1983)
- POSNER, M.R., ANTONIOU, D., GRIFFIN, J., SCHLOSSMAN, S.F., LAZARUS, H.: An enzym linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens in viable cells.
J. Immunol. Methods 48, 23-31 (1982)
- RABOTTI, G.F., GROVE, A.S., SELLERS, R.L., ANDERSON, W.R.: Induction of multiple brain tumors (gliomata and leptomeningeal sarcomata) in dogs by Rous sarcoma virus.
Nature 209, 884-886 (1966)
- RABOTTI, G.F.: Experimental intracranial tumours of viral etiology. In: KIRSCH, W.M., GROSSI, E., PAOLETTI, P. (Eds.) The Experimental Biology of Brain Tumors. Charles C. Thomas, Springfield, Ill., pp. 148-180, 1972
- RABOTTI, G.F., GOGUSEV, J., TEUTSCH, B., MONGIAT-LARDEMER, F., HAGUENAU, F.: Transformation in vitro of glial hamster cells by Rous sarcoma virus.
J. Natl. Cancer Inst. 60, 113-124 (1978)
- RASHEED, S., FREEMAN, A.E., GARDNER, M.B., HUEBNER, R.J.: Acceleration of transformation of rat embryo cells by rat type C virus.
J. Virol. 18, 776-782 (1976a)
- RASHEED, S., BRUSZEWSKI, J., RONGEY, R.W., ROY-BURMAN, P., CHARMAN, H.P., GARDNER, M.B.: Spontaneous release of endogenous ecotropic type C virus from rat embryo cultures.
J. Virol. 18, 799-803 (1976b)

- RHIM, J.S., PARK, D.K., ARNSTEIN, P., HUEBNER, R.J.,
WEISBURGER, E.K., NELSON-REES, W.A.: Transformation
of human cells in culture by N-methyl-N-nitro-N-
nitrosoguanidine.
Nature **256**, 751-753 (1975)
- SANFORD, K.K.: "Spontaneous" neoplastic transformation of
cells in vitro: some facts and theories.
Natl. Cancer Inst. Monogr. **26**, 387-408 (1967)
- SANTOLI, D., WROBLEWSKA, Z., GILDEN, D.H., GIRARDI, A.,
KOPROWSKI, H.: Human brain in tissue culture.
III. PML-SV 40 induced transformation of brain
cells and establishment of permanent lines.
J. Comp. Neurol. **161**, 317-328 (1975)
- SHEIN, H.M.: Neoplastic transformation of hamster astrocytes
and choroid plexus cells in culture by polyoma virus.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. **29**, 70-88 (1970)
- SHEIN, H.M.: Neoplastic transformation induced by simian virus
40 in Syrian hamster neuroglial and meningeal cell
cultures.
Arch. Ges. Virusforsch. **22**, 122-142 (1967)
- SHIMADA, H., SHIBUTA, H., YOSHIKAWA, M.: Transformation of
tissue-cultured xeroderma pigmentosum fibroblasts
by treatment with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine.
Nature **264**, 547-548 (1976)
- STAVROU, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie
experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems
der Ratte. I. Morphologische Befunde.
Acta Neuropath. (Berl.) **15**, 220-230 (1970)
- STAVROU, D.: Zur vergleichenden Pathologie der Tumoren des
Nervensystems. Eine morphologische und enzymhisto-
chemische Studie an spontanen bzw. experimentellen
Tumoren des Nervensystems verschiedener Tierspezies
sowie vergleichbarer Tumoren des Menschen.
Zbl. Vet. Med. A **18**, 585-645 (1971)

- STAVROU, D., SÜSS, Ch., BILZER, Th., KUMMER, U.,
de TRIBOLET, N.: Monoclonal antibodies reactive
with glioma cell lines derived from experimental
brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)
- STEINBACH, J.H., SCHUBERT, D.: Multiple modes of dibutyryl
cyclic AMP-induced process formation by clonal
nerve and glial cells.
Exp. Cell Res. 91, 499 (1975)
- STEPHENSON, J.R., AARONSON, S.A.: Search for antigens and
antibodies cross-reactive with type C viruses of
the woolly monkey and gibbon ape in animal models
and in humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1725-1729 (1976)
- STOCHDORPH, O.: Die Gewebsbilder der Hirngewächse und ihre
Ordnung. Veröffentlichungen a. d. morphologischen
Pathologie, Heft 60, G. Fischer-Verlag, Stuttgart
1955
- SUTER, L., BRÜGGEN, J., SERG, C.: Use of enzyme linked
immunosorbent assay (ELISA) for screening of
hybridoma antibodies against cell surface antigens.
J. Immunol. Methods 39, 407-411 (1980)
- TANAKA, R., KOPROWSKI, H., IWASAKI, Y.: Malignant transfor-
mation of hamster brain cells in vitro by human
papovavirus BK.
J. Natl. Cancer Inst. 56, 671-673 (1976)
- WECHSLER, W., KLEIHUES, P., MATSUMOTO, S., ZÜLCH, K.J.,
IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R., DRUCKREY, H.:
Pathology of experimental neurogenic tumours chemi-
cally induced during prenatal and postnatal life.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 360-408 (1969)

- WEINSTEIN, I.B., ORENSTEIN, J.M., GEBERT, R., KAIGHN, M.E.,
STADLER, U.C.: Growth and structural properties of
epithelial cell cultures established from normal
rat liver and chemically induced hepatomas.
Cancer Res. 35, 253-263 (1975)
- WILLIS, R.A.: Pathology of tumours. Butterworth and Co.,
London 1953
- YANIV, A., EYLAN, E.: Induction of oncornavirus-like
particles from a spontaneously transformed hamster
cell line.
Israel J. Med. Sci. 14, 228-237 (1978)
- YEH, M.Y., HELLSTRÖM, I., HELLSTRÖM, E.K.: Clonal variation
in expression of a human melanoma antigen defined
by a monoclonal antibody.
J. Immunol. 126, 1312-1317 (1981)
- ZOMZELY-NEURATH, C.E., WALKER, W.: Nervous system specific
proteins: 14-3-2 protein, neuron specific enolase,
and S-100 protein. In: BRADSHAW, R.A. and SCHNEIDER,
D.M. (Eds.): Proteins of the nervous system, 2nd
Edition, Raven Press, New York 1980
- ZUCKERMAN, J.E., HERSCHMAN, H.R., LEVIN, L.: Appearance of
a brain specific antigen (the S-100 protein) during
human foetal development.
J. Neurochem. 17, 247-251 (1970)

LEBENS LAUF

19. 12. 1935: Geboren in Arta/Griechenland
- 1956: Abitur
- 1956 - 1959: Präsenzdienst bei der Königlichen Griechischen Armee
- 1959 - 1964: Studium der Veterinärmedizin, Tierärztliche Hochschule Wien
- 1965: Promotion zum Dr. med. vet., Tierärztliche Hochschule Wien
- 1964 - 1966: Wiss. Assistent am Institut für Pathologie (Prof. Dr. H. Köhler), Tierärztliche Hochschule Wien
- 1966 - 1980: Wiss. Assistent bzw. Oberassistent am Institut bzw. Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie (Prof. Dr. E. Dahme), Universität München
- 1971: Habilitation für das Fach "Allgemeine Pathologie, Pathologische Anatomie und Histologie"
- 1973: Deutsche Staatsangehörigkeit
- 1977: apl. Prof. für Allgemeine Pathologie, Pathologische Anatomie und Histologie
- 1978 - 1983: Studium der Medizin, Medizinische Fakultät, Aristoteles Universität Thessaloniki
- 1980: Prof. für Funktionelle Pathologie
- 1983: Ärztliches Staatsexamen
- 1984: Erteilung der Approbation als Arzt

